

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE DE RECHERCHE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
À L'OBTENTION DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE
ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
SOLANGE LANDREVILLE, B. Sc. (Biologie médicale)

IDENTIFICATION DE GÈNES RESPONSABLES DE L'AGRESSIVITÉ
TUMORALE DU MÉLANOME UVÉAL ET DE LA FORMATION DE
MÉTASTASES HÉPATIQUES

NOVEMBRE 2003

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Vous êtes tellement nombreux à m'avoir aidée d'une façon ou d'une autre à poursuivre mon projet de maîtrise, qu'une page n'aurait pas été suffisante pour vous remercier tous. Un grand merci malgré tout, à ceux et celles qui ont contribué à mes travaux de recherche et que je ne mentionnerai pas aujourd'hui.

Mes premières pensées vont à ma famille, à mes amis et particulièrement à Charles, pour leur soutien et leurs encouragements constants.

Mes remerciements sincères à mon directeur de recherche Dr Christian Salesse pour avoir partagé avec moi ses nombreuses connaissances et pour m'avoir confié ce projet passionnant sur le mélanome uvéal.

Merci également à Marc-André Laurin et Dominique Verreault pour les longues « discussions » plus ou moins houleuses que nous avons eues sur différents sujets, scientifiques ou non... Merci également Marc-André pour ton aide en informatique et pour toutes ces petites choses qu'il serait trop long d'énumérer.

Un grand merci à Caroline Lupien pour ses conseils, ainsi que son aide précieuse pour la banque de soustraction, à l'assistante de recherche Mme Marcelle Giasson pour avoir effectué le marquage sur la lignée cancéreuse HepG2, et pour toutes les autres petites choses qu'il serait trop long d'énumérer, à M. Maurice Dufour pour les mesures en cytométrie de flux, à Stéphanie Proulx et Stéphanie Coulombe pour leur aide en microscopie et en culture cellulaire, ainsi qu'aux autres étudiant(e)s gradué(e)s et assistants de recherche des laboratoires des Drs Christian Salesse, Sylvain L. Guérin et Lucie Germain.

Enfin, merci aux donateurs de la Banque d'Yeux Nationale du CHUL et au FCAR pour son soutien financier.

RÉSUMÉ

Avoir le cancer et devenir aveugle sont deux perspectives effrayantes. Ces deux états sont malheureusement combinés lors du développement d'une tumeur intraoculaire. Le mélanome uvéal représente la principale forme de tumeur intraoculaire maligne dans la population adulte, six nouveaux cas par million d'individus étant rapportés annuellement, soit 45 cas par an au Québec. Puisqu'il n'y a pas de circulation lymphatique intraoculaire, le haut niveau de vascularisation de la choroïde permet d'expliquer le fort potentiel de dispersion hématogénique de ce cancer. En effet, plus de 50% des patients souffrant de mélanome uvéal développeront des métastases à divers organes à l'intérieur des quinze années qui suivront le traitement de la tumeur primaire par énucléation ou par radiothérapie. Chez 97% des cas de mélanomes uvéaux, le site initial de formation de métastases est le foie. L'atteinte de cet organe représente d'ailleurs la principale cause de décès. Enfin, le mélanome uvéal métastatique est une maladie incurable, le diagnostic étant généralement associé à une espérance de vie variant de deux à sept mois.

L'objectif principal de ce projet de maîtrise consistait à identifier les gènes responsables de la formation du mélanome uvéal et des métastases hépatiques. Le présent mémoire rend compte des différentes démarches entreprises pour atteindre cet objectif.

Dans un premier temps, la caractérisation par cytométrie de flux du profil d'expression des intégrines des mélanocytes choroïdiens normaux (MCN) et des lignées cancéreuses TP31 et SP8.0 dérivées d'un mélanome uvéal, a permis d'établir que le profil d'expression des intégrines des deux lignées cancéreuses diffère de celui des MCN (absence de la sous-unité $\beta 4$). Ces résultats et d'autres informations (plus grande agressivité et absence de traitement par radiothérapie de la tumeur primaire à partir de laquelle la lignée cancéreuse TP31 a été mise en culture) nous ont permis de sélectionner la lignée cancéreuse TP31 parmi les lignées de tumeurs primaires du mélanome uvéal

disponibles (SP6.5, SP8.0 et TP31) pour la construction de la banque de soustraction « tumeur primaire (lignée TP31) – MCN ».

Ensuite, la construction d'une banque de soustraction « lignée TP31 – MCN » à l'aide de la trousse vendue par la compagnie *Clontech* a permis de comparer les populations d'ARNm de la lignée cancéreuse TP31 avec celles des MCN et d'amplifier les gènes qui sont exprimés spécifiquement par la tumeur primaire. Les produits PCR obtenus à la fin de la soustraction ont ensuite été clonés pour créer une librairie de clones candidats. Avant de débiter le séquençage, les faux positifs ont été éliminés par criblage différentiel et la séquence nucléotidique des clones retenus a été recherchée dans les diverses banques de données accessibles. Les résultats de séquençage nous ont permis d'identifier des gènes partiellement caractérisés, spécifiquement exprimés par la tumeur primaire.

Enfin, la caractérisation du phénotype par immunofluorescence indirecte à l'aide de marqueurs spécifiques aux cellules épithéliales (cytokératines), aux cellules stromales (vimentine), au mélanome (HMB45) ou aux cellules cancéreuses hépatiques (α -fétoprotéine (AFP)), a permis de déterminer que la lignée hépatique H79, provenant d'une métastase du mélanome uvéal, est de type épithélioïde et qu'elle ne provient pas de la transformation maligne d'un hépatocyte. La détermination du profil d'expression des intégrines de la lignée H79 par cytométrie de flux a démontré que cette lignée exprime un plus grand nombre de sous-unités d'intégrines et que son profil d'expression diffère des MCN et des lignées cancéreuses TP31 et SP8.0. La lignée hépatique H79 sera utilisée lors de la construction ultérieure d'une banque de soustraction « tumeur primaire (lignée TP31) – métastase hépatique (lignée H79) » afin d'identifier des gènes responsables du potentiel métastatique du mélanome uvéal.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS	xvi
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Anatomie du globe oculaire	1
1.1.1 Les vaisseaux sanguins de l'oeil	4
1.1.2 La choroïde	6
1.1.2.1 Fonctions de la choroïde.....	6
1.1.2.2 Les mélanocytes choroïdiens	8
1.2 Le mélanome uvéal	10
1.2.1 Épidémiologie, facteurs pronostics et traitement du mélanome uvéal.....	11
1.2.1.1 Épidémiologie et facteurs prédisposants au mélanome uvéal	11
1.2.1.1.1 Facteurs prédisposants au mélanome uvéal.....	11
1.2.1.2 Traitement du mélanome uvéal.....	15
1.2.2 Classification cytologique du mélanome uvéal	16
1.2.3 La propagation métastatique du mélanome uvéal.....	17
1.2.4 Comparaison entre les mélanomes uvéal et cutané.....	18
1.3 Les intégrines	21
1.3.1 Structure et fonctions des intégrines	21
1.3.1.1 Structure de la sous-unité α	24

1.3.1.2 Structure de la sous-unité β	25
1.3.2 Expression des intégrines dans la choroïde et le mélanome uvéal.....	26
1.4 Objectifs de recherche	27
1.4.1 Objectif global.....	28
1.4.1.1 Premier objectif spécifique	28
1.4.1.1.1 Cytométrie de flux à l'aide d'anticorps spécifiques aux sous-unités d'intégrines	28
1.4.1.2 Deuxième objectif spécifique	28
1.4.1.2.1 Banque de soustraction « tumeur primaire (lignée TP31) – MCN ».....	29
1.4.1.2.2 Librairie de clones candidats spécifiques à la lignée TP31.....	29
1.4.1.2.3 Criblage différentiel de la librairie de clones candidats à l'aide de sondes d'ADNc	29
1.4.1.2.4 Analyse bioinformatique des clones spécifiques à la lignée TP31	30
1.4.1.2.5 Amplification PCR des clones intéressants avec différents tissus normaux et lignées cancéreuses	30
1.4.1.3 Troisième objectif spécifique.....	30
1.4.1.3.1 Immunofluorescence indirecte à l'aide de marqueurs cellulaires spécifiques	31
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	32
2.1 Culture cellulaire des MCN et des lignées cancéreuses	32
2.1.1 Dissection des globes oculaires humains.....	32
2.1.2 Mise en culture des MCN et des lignées cancéreuses.....	33
2.1.2.1 Isolation des MCN à partir de la choroïde et leur mise en culture.....	33
2.1.2.2 Isolation des lignées cancéreuses à partir d'une tumeur et leur mise en culture.....	34

2.2 Cytométrie de flux.....	37
2.2.1 Marquage des cellules pour la cytométrie de flux	38
2.2.2 Interprétation des résultats de cytométrie de flux	39
2.3 CONSTRUCTION D'UNE Banque de soustraction « tumeur primaire (lignée TP31) – MCN »	40
2.3.1 Préparation de l'ARN et de l'ADNc des MCN et de la lignée cancéreuse TP31	41
2.3.1.1 Extraction de l'ARNm des MCN et de la lignée cancéreuse TP31	41
2.3.1.2 Transcription de l'ARNm des MCN et de la lignée cancéreuse TP31 en ADNc : principe de la trousse <i>Smart PCR cDNA</i> <i>Synthesis</i>	43
2.3.1.2.1 Synthèse du premier brin d'ADNc	44
2.3.1.2.2 Amplification de l'ADNc par <i>long-distance polymerase</i> <i>chain reaction</i> (LD PCR)	45
2.3.1.2.3 Chromatographie sur colonne.....	47
2.3.1.2.4 Digestion de l'ADNc avec l'enzyme de restriction <i>RsaI</i>	48
2.3.1.2.5 Purification de l'ADNc digéré.....	49
2.3.2 Principe de la banque de soustraction « (lignée TP31) – MCN ».....	49
2.3.2.1 Ligation des adaptateurs de la banque de soustraction	53
2.3.2.1.1 Analyse du résultat de la ligation des adaptateurs	55
2.3.2.2 Première hybridation de la banque de soustraction.....	57
2.3.2.3 Deuxième hybridation de la banque de soustraction.....	58
2.3.2.4 Première amplification PCR de la banque de soustraction	59
2.3.2.5 Deuxième amplification PCR de la banque de soustraction.....	60
2.3.2.5.1 Analyse PCR de l'efficacité de la soustraction.....	61
2.3.3 Clonage du produit PCR de la banque de soustraction directe (« lignée TP31 – MCN »).....	63
2.3.3.1 Purification du produit PCR de la banque de soustraction directe	63
2.3.3.2 Clonage du produit PCR de la banque de soustraction directe.....	63

2.3.4 Criblage différentiel de la librairie de clones candidats	65
2.3.4.1 Amplification des inserts d'ADNc par PCR.....	66
2.3.4.2 Préparation des membranes pour le criblage différentiel.....	67
2.3.4.3 Préparation des sondes d'ADNc pour le criblage différentiel.....	68
2.3.4.4 Hybridation des sondes marquées avec les membranes.....	68
2.3.5 Purification des produits PCR des clones spécifiques à la lignée cancéreuse TP31 pour effectuer leur séquençage	72
2.3.6 Analyse bioinformatique des clones spécifiques à la lignée TP31	72
2.3.7 RT-PCR en utilisant l'ARN de différents tissus normaux et de lignées cancéreuses	73
2.3.7.1 Préparation de l'ARN et de l'ADNc des MCN, des lignées cancéreuses et des tissus normaux	73
2.3.7.1.1 Extraction de l'ARN des MCN et des lignées cancéreuses.....	73
2.3.7.1.2 Extraction de l'ARN des tissus normaux	74
2.3.7.2 Transcription de l'ARN des tissus normaux et des lignées cancéreuses en ADNc.....	75
2.3.7.3 Amplifications PCR avec l'ADNc de tissus normaux et de lignées cancéreuses	75
2.4 immunofluorescence indirecte	77
2.4.1 Préparation des lamelles	77
2.4.2 Immunofluorescence indirecte des cellules sur lamelles à l'aide de marqueurs cellulaires spécifiques	77
CHAPITRE 3 RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	80
3.1 Caractérisation des MCN et des lignées cancéreuses dérivées du mélanome uvéal 80	
3.1.1 Comparaison morphologique entre les MCN et les lignées cancéreuses TP31 et H79.....	80

3.1.2 Analyse du profil d'expression des intégrines des MCN et des lignées cancéreuses TP31, SP8.0 et H79.....	81
3.2 Identification de gènes exprimés spécifiquement par la lignée TP31 provenant d'une tumeur primaire du mélanome uvéal à l'aide d'une banque de soustraction	92
3.2.1 Banque de soustraction « tumeur primaire (lignée TP31) – MCN »	92
3.2.2 Librairie de clones candidats spécifiques à la lignée TP31	101
3.2.3 Criblage différentiel de la librairie de clones candidats	102
3.2.4 Analyse bioinformatique des clones spécifiques à la lignée TP31	114
3.2.5 Amplification PCR des clones intéressants avec différents tissus normaux et lignées cancéreuses.....	138
3.2.6 Comparaison des résultats de la banque de soustraction « lignée TP31 – MCN » avec d'autres études sur le mélanome uvéal ayant utilisé les techniques de banque de soustraction et de criblage de micropuces d'ADNc (<i>microarray</i>).....	142
3.3 Détermination du phénotype de la lignée hépatique H79 par immunofluorescence indirecte à l'aide de marqueurs cellulaires spécifiques	149
CHAPITRE 4 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....	153
4.1 RÉCAPITULATION DES RÉSULTATS.....	153
4.2 CONCLUSIONS	155
4.3 PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....	160
RÉFÉRENCES	162

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1	Sites des métastases des mélanomes uvéaux de la choroïde et du corps ciliaire	18
TABLEAU 1.2	Les intégrines et leurs ligands.....	23
TABLEAU 2.1	Suppléments ajoutés au milieu de culture des MCN	34
TABLEAU 2.2	Lignées cancéreuses utilisées	35
TABLEAU 2.3	Suppléments ajoutés au milieu de culture des lignées cancéreuses HeLa, H79, Jurkat, SP6.5, SP8.0 et TP31.....	36
TABLEAU 2.4	Suppléments ajoutés au milieu de culture de la lignée cancéreuse HepG2.....	37
TABLEAU 2.5	Anticorps primaires et secondaires utilisés en cytométrie de flux.....	39
TABLEAU 2.6	Donneurs utilisés pour l'extraction de l'ARN des MCN	41
TABLEAU 2.7	Concentration des réactifs utilisés pour le mélange mère des réactions PCR	45
TABLEAU 2.8	Réactifs utilisés pour la ligation des adaptateurs	54
TABLEAU 2.9	Réactifs utilisés pour l'analyse de la ligation des adaptateurs.....	55
TABLEAU 2.10	Réactifs utilisés pour le mélange mère.....	56
TABLEAU 2.11	Réactifs utilisés pour la première hybridation	57
TABLEAU 2.12	Réactifs utilisés pour la deuxième hybridation.....	58
TABLEAU 2.13	Réactifs utilisés pour le mélange mère de la première amplification PCR.....	59
TABLEAU 2.14	Réactifs utilisés pour le mélange mère de la première amplification PCR.....	60
TABLEAU 2.15	Réactifs utilisés pour l'analyse PCR de l'efficacité de la soustraction.....	61

TABLEAU 2.16	Réactifs utilisés pour l'amplification des inserts d'ADNc.....	66
TABLEAU 2.17	Réactifs utilisés pour le mélange mère servant à la préparation des sondes.....	68
TABLEAU 2.18	Interprétation des résultats de criblage différentiel.....	71
TABLEAU 2.19	Concentrations finales des réactifs utilisés lors des réactions PCR	76
TABLEAU 2.20	Compilation des différentes amorces utilisées pour les amplifications PCR	76
TABLEAU 2.21	Contrôles positifs en immunofluorescence indirecte	78
TABLEAU 2.22	Caractéristiques des anticorps primaires et secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte	79
TABLEAU 3.1	Profil d'expression des intégrines des MCN et des lignées cancéreuses TP31, SP8.0 et H79	86
TABLEAU 3.2	Compilation des résultats du criblage différentiel	109
TABLEAU 3.3	Liste des clones envoyés au séquençage	115
TABLEAU 3.4	Clones codant pour des protéines connues.....	116
TABLEAU 3.5	Clones correspondant à des ESTs ou à des HTGS	128
TABLEAU 3.6	Clones correspondant à des ESTs de la vision et de l'audition.....	133
TABLEAU 3.7	Clones inconnus	137
TABLEAU 3.8	Détermination du phénotype de la lignée hépatique H79	150

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1	Coupe transversale du globe oculaire	2
FIGURE 1.2	Organisation laminaire de la rétine	4
FIGURE 1.3	Vaisseaux sanguins de l'œil	5
FIGURE 1.4	Coupe histologique de la choroïde.....	7
FIGURE 1.5	Organisation lobulaire des choriocapillaires	8
FIGURE 1.6	Les mélanocytes choroïdiens.....	9
FIGURE 1.7	Les différents stades de maturation du mélanosome	10
FIGURE 1.8	Coupe sagittale d'un mélanome uvéal	11
FIGURE 1.9	Les cellules épithélioïdes.....	16
FIGURE 1.10	Structure d'une intégrine.....	22
FIGURE 1.11	Domaine en hélice β des intégrines	24
FIGURE 2.1	Résultats typiques de cytométrie de flux.....	40
FIGURE 2.2	Étapes de la trousse <i>Smart PCR cDNA Synthesis</i>	44
FIGURE 2.3	Liaison des adaptateurs au <i>tester</i>	51
FIGURE 2.4	Hybridations des transcrits des deux types de cellules	51
FIGURE 2.5	Amplifications PCR des molécules de types C et E	52
FIGURE 2.6	Effet suppresseur PCR empêchant l'amplification des molécules de type B	53
FIGURE 2.7	Résultat typique de l'analyse de la ligation.....	56
FIGURE 2.8	Résultat typique de l'analyse PCR de l'efficacité de la soustraction.....	62
FIGURE 2.9	Clonage du produit PCR « lignée TP31 – MCN » soustrait	64

FIGURE 2.10	Résultat typique de l'amplification des inserts d'ADNc.....	67
FIGURE 2.11	Résultat typique d'un criblage différentiel.....	70
FIGURE 3.1	Morphologie des MCN et des lignées cancéreuses TP31 et H79.....	81
FIGURE 3.2	Profil d'expression des intégrines des MCN.....	82
FIGURE 3.3	Profil d'expression des intégrines de la lignée TP31.....	83
FIGURE 3.4	Profil d'expression des intégrines de la lignée SP8.0.....	84
FIGURE 3.5	Profil d'expression des intégrines de la lignée H79.....	85
FIGURE 3.6	Évaluation du nombre optimum de cycles PCR pour les MCN et la lignée TP31.....	93
FIGURE 3.7	Validation du nombre optimum de cycles PCR (20 et 17) et vérification de l'intégrité de l'ADNc pour les MCN et la lignée TP31.....	94
FIGURE 3.8	Purification de l'ADNc amplifié des MCN et de la lignée TP31 par chromatographie sur colonne.....	95
FIGURE 3.9	Digestion de l'ADNc des MCN et de la lignée TP31 avec l'enzyme de restriction <i>RsaI</i>	96
FIGURE 3.10	Purification de l'ADNc digéré des MCN et de la lignée TP31.....	96
FIGURE 3.11	Analyse de l'efficacité de la ligation des adaptateurs pour les soustractions directe et inverse.....	98
FIGURE 3.12	Analyse de la première amplification PCR des soustractions directe et inverse.....	98
FIGURE 3.13	Analyse de la deuxième amplification PCR des soustractions directe et inverse.....	99
FIGURE 3.14	Analyse de l'efficacité de la soustraction directe.....	100
FIGURE 3.15	Analyse de l'efficacité de la soustraction inverse.....	100
FIGURE 3.16	Amplification des inserts des colonies 1 à 96 de la gélose 1.....	104

FIGURE 3.17	Amplification des inserts des colonies 1 à 96 de la gélose 2.....	105
FIGURE 3.18	Amplification des inserts des colonies 1 à 96 de la gélose 3.....	106
FIGURE 3.19	Amplification des inserts des colonies 1 à 96 de la gélose 4.....	107
FIGURE 3.20	Amplification des inserts des colonies 97 à 120 des géloses 1 à 4.....	108
FIGURE 3.21	Sélection des clones spécifiques à la lignée TP31 par criblage différentiel (gélose 1, clones 1-96)	110
FIGURE 3.22	Sélection des clones spécifiques à la lignée TP31 par criblage différentiel (gélose 2, clones 1-96)	111
FIGURE 3.23	Sélection des clones spécifiques à la lignée TP31 par criblage différentiel (gélose 3, clones 1-96)	112
FIGURE 3.24	Sélection des clones spécifiques à la lignée TP31 par criblage différentiel (gélose 4, clones 1-96)	113
FIGURE 3.25	Sélection des clones spécifiques à la lignée TP31 par criblage différentiel (géloses 1 à 4, clones 97-120)	113
FIGURE 3.26	Amplification PCR de la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ dans les MCN et les lignées SP6.5 et TP31	125
FIGURE 3.27	Classification des clones codant pour des protéines connues selon leur fonction.....	127
FIGURE 3.28	Classification des clones codant pour des protéines connues ou correspondant à des ESTs ou à des HTGS selon leur localisation chromosomique	134
FIGURE 3.29	Caryotype de la lignée TP31 par analyse caryotypique spectrale.....	135
FIGURE 3.30	Vérification de l'intégrité de l'ADNc des tissus normaux et des lignées cancéreuses	139
FIGURE 3.31	Vérification de la spécificité du clone G2-8 par amplification PCR avec l'ADNc de tissus normaux et de lignées cancéreuses....	139

FIGURE 3.32	Vérification de la spécificité du clone G2-13 par amplification PCR avec l'ADNc de tissus normaux et de lignées cancéreuses....	140
FIGURE 3.33	Vérification de la spécificité du clone G2-44 par amplification PCR avec l'ADNc de tissus normaux et de lignées cancéreuses....	141
FIGURE 3.34	Vérification de la spécificité du clone G2-81 par amplification PCR avec l'ADNc de tissus normaux et de lignées cancéreuses....	142
FIGURE 3.35	Analyse du phénotype de la lignée hépatique H79 par immunofluorescence indirecte.....	151

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

AFP	Alpha-fétoprotéine
ANP32E	<i>Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 member E</i>
ARHGDIB	<i>Rho GDP dissociation inhibitor</i>
ATP5JG	<i>ATP synthase, H⁺ transporting mitochondrial F₀ complex subunit g</i>
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BS	Banque de soustraction
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CALLA	<i>Neutral endopeptidase</i>
CDNK2	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2a</i>
CF	Cytométrie de flux
ch-TOG	<i>Colonic and hepatic tumor over-expressed gene</i>
CS-1	<i>Connecting segment-1</i>
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
CYR61	<i>Cysteine-rich 61</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle media</i>
DTT	Dithiothréitol
ECK	<i>Epithelial cell kinase</i>
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EPR	Épithélium pigmentaire rétinien
EST	<i>Expressed sequence tags</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FasL	Ligand du récepteur Fas
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
GITC	<i>Guanidine isothiocyanate</i>
GLNS	Glutamine synthétase

GPM6B	<i>Membrane glycoprotein M6b</i>
GSH	Glutathione
HCLS1	<i>Hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1</i>
HEPES	Acide N-[2-hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[2-éthanesulfonique]
HLA-DM	<i>MHC class II antigen M alpha</i>
HMB45	<i>Melanoma marker clone HMB45</i>
HMB50	<i>Melanoma marker clone HMB50</i>
HTGS	<i>High throughput genomic sequences</i>
IBMX	Isobutylméthylxanthine
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
I-EGF	<i>Integrin-epidermal growth factor</i>
IF	Immunofluorescence indirecte
IFN- γ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IL-1	Interleukine-1 bêta
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphate
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
KCNB1	<i>Shab-related potassium voltage-gated channel 1</i>
LD PCR	<i>Long-distance polymerase chain reaction</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LMAN1	<i>Mannose-binding lectin-1</i>
MadCAM	<i>Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule</i>
MAP	<i>Microtubule associated protein</i>
Melan-A	<i>Melanoma antigen</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MC3R	<i>Melanocortin 3 receptor</i>
MCFD2	<i>Multiple coagulation factor deficiency protein 2</i>
MCN	Mélanocytes choréïdiens normaux
MHBSS	<i>Modified Hanks balanced salt solution</i>
MIDAS	<i>Metal ion-dependent adhesion site</i>
MIF	<i>Migration inhibitory factor</i>

MIFT	<i>Microphthalmia transcription factor</i>
MLH3	<i>MutL E. coli homolog 3</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEIBank	<i>National Eye Institute Bank</i>
NEIBLAST	<i>National Eye Institute basic local alignment search tool</i>
NF-AT	<i>Nuclear factor of activated transcription</i>
NKI/C3	<i>Melanoma marker CD63 clone NKI/C3</i>
p75NTR	<i>p75 neutrophin receptor</i>
PAX	<i>Protein paired-box gene</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Réaction de polymérase en chaîne</i>
PE-CAM	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PLAU	<i>Urokinase-type plasminogen activator</i>
PMA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acétate</i>
PPARGC1	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, coactivator 1</i>
PPP3CA	<i>Protein phosphatase 3 (formerly 2B) catalytic subunit alpha isoform</i>
P/S	<i>Pénicilline/streptomycine</i>
PSI	<i>Plexine/sémaphorine/intégrine</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue</i>
PVP	<i>Polyvinylpyrrolidone</i>
RACE	<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>
RAMP	<i>Retinoic acid-regulated nuclear matrix-associated protein</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
SAP	<i>Serum amyloid P component</i>
SDS	<i>Dodécylsulfate de sodium</i>
SSC	<i>Sodium chloride/sodium citrate</i>
TBE	<i>Tris/borate/EDTA</i>
TE	<i>Tris/EDTA</i>

TF	<i>Tissue factor</i>
TIE-1	Tyrosine kinase avec des domaines homologues à l'immunoglobuline et au facteur de croissance épidermal
TIMM17A	<i>Translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog A</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNE	Tris-HCl/NaCl/EDTA
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TOP2A	<i>Topoisomerase (DNA) II alpha</i>
TPM	Tubes photomultiplicateurs
TRITC	Tétraméthylrhodamine isothiocyanate
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VIH	Virus d'immunodéficience humaine
VRK1	<i>Vaccinia related kinase 1</i>
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 ANATOMIE DU GLOBE OCULAIRE

Organe de la vision, l'œil nous permet d'apprécier visuellement notre environnement, grâce à la réponse photochimique des cônes et bâtonnets visuels lors de leur stimulation par la lumière.

Le globe oculaire est une structure sphérique divisée en trois chambres : la chambre antérieure (en avant de l'iris), la chambre postérieure (derrière l'iris) et la chambre vitrée (derrière le cristallin) (voir figure 1.1) (Marieb, 1992; Tortora et Grabowski, 1994). Les chambres antérieure et postérieure contiennent l'humeur aqueuse, alors que la chambre vitrée contient une substance gélatineuse appelée humeur vitrée. L'humeur aqueuse et l'humeur vitrée contribuent à maintenir la forme du globe oculaire et à réfracter la lumière.

La paroi du globe se divise en trois tuniques distinctes : fibreuse, vasculaire et nerveuse (Marieb, 1992; Tortora et Grabowski, 1994). La tunique fibreuse est la membrane externe, composée de la sclérotique (partie postérieure) et de la cornée (partie antérieure) (voir figure 1.1). La sclérotique est un tissu fibreux blanchâtre qui enveloppe tout le globe, lui donnant sa forme et protégeant ses structures internes. Sa face postérieure est traversée par le nerf optique. La cornée est une couche transparente et non vascularisée. Sa forme incurvée contribue à focaliser les rayons lumineux sur la rétine. L'épithélium de sa face externe se prolonge avec la conjonctive bulbaire, une membrane recouvrant la face exposée du globe oculaire et la face interne des paupières (Marieb, 1992; Tortora et Grabowski, 1994).

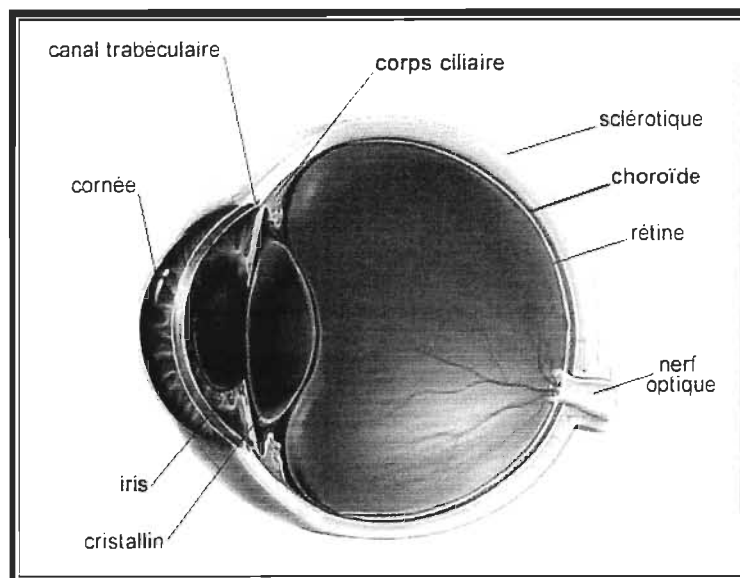


FIGURE 1.1: Coupe transversale du globe oculaire. Image tirée du site Internet <http://neibank.nei.nih.gov>.

La tunique vasculaire, aussi appelée uvée, contient, en plus des vaisseaux sanguins, des nerfs, différents tissus de soutien et un grand nombre de mélanocytes (Marieb, 1992; Tortora et Grabowski, 1994). Le réseau de vaisseaux sanguins de l'oeil sera détaillé dans la prochaine section (voir section 1.1.1.). L'uvée est divisée en trois parties : la choroïde, le corps ciliaire et l'iris (voir figure 1.1). La choroïde (partie postérieure) est une membrane mince et brun foncé qui tapisse pratiquement toute la face interne de la sclérotique et qui est traversée également par le nerf optique. Elle devient le corps ciliaire à la partie antérieure de la tunique vasculaire. Une description approfondie de la choroïde suivra dans la prochaine section (voir section 1.1.2). Le corps ciliaire constitue la couche la plus épaisse de la tunique vasculaire. Il est composé des procès ciliaires qui sécrètent l'humeur aqueuse et du muscle ciliaire qui modifie la courbure du cristallin pour faciliter l'accommodation. La troisième partie de l'uvée, l'iris (partie colorée) (voir figure 1.1), est composée de fibres musculaires lisses, radiales et circulaires, disposées en forme d'anneau. L'ouverture au centre de l'iris permettant le passage de la lumière est la pupille. L'iris règle la quantité de lumière qui pénètre dans le globe oculaire : en présence d'une lumière vive, les muscles circulaires se contractent et diminuent le diamètre de la pupille, alors qu'en présence d'une faible lumière, les

muscles radiaires se contractent pour dilater la pupille (Marieb, 1992; Berson, 1993; Tortora et Grabowski, 1994).

La tunique nerveuse ou rétine est la membrane interne qui recouvre les trois quarts postérieurs de l'œil (voir figure 1.1). Elle constitue le début de la voie nerveuse visuelle. Sa fonction est de capter la lumière, de convertir cette information en influx nerveux qui sera transmis au cerveau via le nerf optique. Elle est formée d'une couche neurale et de l'épithélium pigmentaire rétinien (Marieb, 1992) (voir figure 1.2). La rétine neurale est divisée en trois couches: les photorécepteurs, les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires. Ces différentes couches sont séparées par deux zones de contacts synaptiques, soit les couches plexiformes interne et externe. Les photorécepteurs sont à leur tour subdivisés en deux types cellulaires nommés en fonction de leur morphologie : les bâtonnets et les cônes (voir figure 1.2). Les bâtonnets permettent de voir en présence d'une faible lumière, de différencier les tons de lumière et d'ombre, ainsi que d'apprécier les formes et les mouvements, alors que les cônes sont des cellules spécialisées pour la vision des couleurs et l'acuité visuelle. Ces derniers ne sont stimulés que par la lumière vive ; ceci explique pourquoi on ne peut pas distinguer les couleurs après la tombée de la nuit. Trois autres types de cellules sont présentes dans la rétine neurale: les cellules horizontales, les cellules amacrines et les cellules de Müller (voir figure 1.2). Les deux premières constituent des voies qui modifient les signaux transmis des photorécepteurs aux cellules ganglionnaires. Les cellules de Müller jouent un rôle non seulement de soutien, mais également de transport de métabolites du système sanguin vers les cellules neuronales. Enfin, l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) (voir figure 1.2) est une monocouche de cellules épithéliales séparant la rétine neurale de la choroïde. Cette couche de cellules est, entre autres, essentielle à l'intégrité structurale et fonctionnelle des photorécepteurs, car elle permet leur phagocytose et la digestion de leurs segments externes (Young et Bok, 1969). Elle est également la principale composante de la barrière hémato-oculaire (Clark et Hall, 1986).

En plus des trois tuniques précédentes, le globe oculaire renferme également le cristallin. Il est situé immédiatement derrière la pupille et l'iris. Formé d'un grand

nombre de couches de fibres protéiques dont la disposition rappelle celle des couches d'un oignon, il est généralement transparent. Son rôle est de réfracter les rayons lumineux qui le traversent (Marieb, 1992).

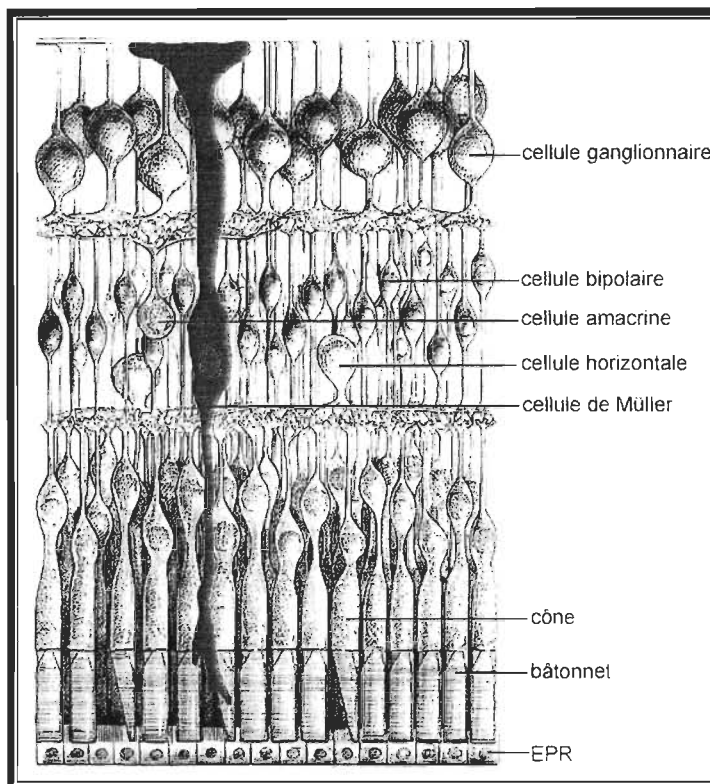


FIGURE 1.2: Organisation laminaire de la rétine. image tirée du site Internet <http://www.psych.stanford.edu>.

1.1.1 Les vaisseaux sanguins de l'œil

Les vaisseaux sanguins de l'œil dérivent de l'artère ophtalmique (Vaughan et al., 1995). Exception faite des vaisseaux centraux de la rétine (voir figure 1.3), qui nourrissent la rétine interne, la presque totalité de l'apport sanguin de l'œil provient des vaisseaux de l'uvée. D'abord, deux longues artères ciliaires postérieures traversent la sclérotique près du nerf optique (voir figure 1.3), en positions médiane et latérale, pour donner naissance de trois à cinq branches qui vont former les choriocapillaires antérieurs (absents sur la figure 1.3), lesquels vont irriguer l'iris et le corps ciliaire. Ensuite, sept artères ciliaires antérieures vont approvisionner la conjonctive (voir figure 1.3). Ces

artères traversent également la sclérotique pour nourrir le corps ciliaire et la région périphérique de la choroïde. Enfin, entre dix et vingt courtes artères ciliaires postérieures entrent dans la sclérotique près du nerf optique pour nourrir la portion postérieure de la choroïde (voir figure 1.3). Les branches terminales de ces artères approvisionnent les choriocapillaires postérieurs (absents sur la figure 1.3) par distribution segmentaire. Les choriocapillaires se drainent ensuite dans de plus grosses veines choroïdiennes et éventuellement dans les quatre veines vortex (voir figure 1.3) (Shields et Shields, 1992; Vaughan et al., 1995). Ces systèmes veineux sont situés dans chacun des quadrants postérieurs du globe oculaire. Les différentes veines de la choroïde convergent vers une structure nommée l'ampoule située à proximité de la face interne de la sclère et de cette ampoule jaillit une veine vortex qui quitte le globe oculaire en passant au travers de la sclère (voir figure 1.3).

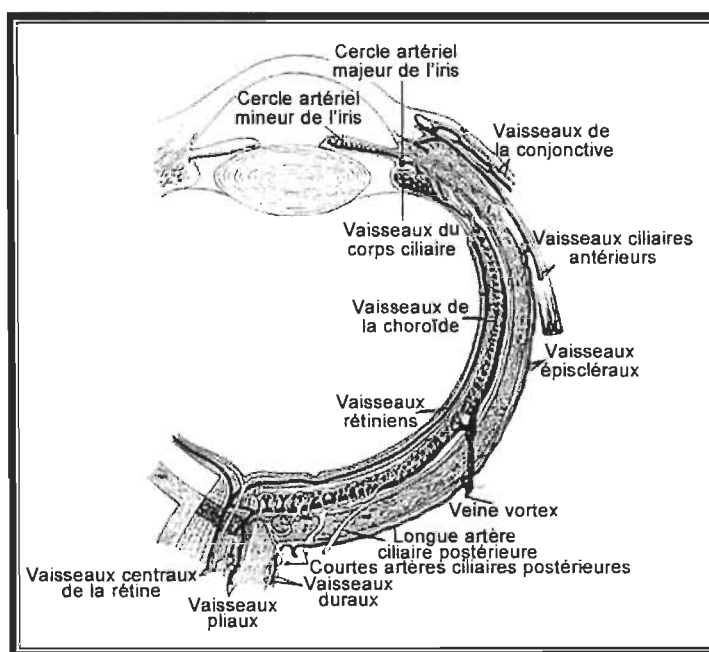


FIGURE 1.3: Vaisseaux sanguins de l'œil. Image tirée de Vaughan *et al.* (1995).

Il est important de souligner l'absence de canaux lymphatiques intraoculaires, d'où la dissémination exclusivement hématogénique des cellules cancéreuses du mélanome uvéal (le mélanome uvéal sera abordé dans la section 1.2).

1.1.2 La choroïde

Feuillet brun foncé qui se confond dans sa partie externe avec la sclérotique et qui est au contact de la rétine dans sa partie interne, la choroïde s'étend de l'ora serrata au nerf optique (voir figure 1.1).

1.1.2.1 Fonctions de la choroïde

La choroïde fournit une surface régulière et flexible qui supporte la rétine et maintient intactes les interactions entre l'EPR et les segments externes des photorécepteurs. Elle transforme également le globe oculaire en chambre noire grâce à un pigment, la mélanine, qui est présente dans les nombreux mélanocytes de cette couche. Ces derniers seront abordés en détail dans la sous-section 1.1.2.2. La mélanine permet d'absorber les rayons lumineux épars, pour ainsi prévenir la réflexion et la dispersion de la lumière dans le globe oculaire et assurer la netteté de l'image produite sur la rétine (Marieb, 1992; Tortora et Grabowski, 1994).

Essentiellement composée de vaisseaux sanguins, la choroïde permet de maintenir constante la température de l'œil et de jouer un rôle mineur dans le maintien de la pression oculaire (Hogan et al., 1971). Elle est responsable également de la nutrition et de l'oxygénation de la rétine externe. La choroïde est divisée en quatre couches principales : (1) la membrane de Bruch, (2) la couche de choriocapillaires, (3) le stroma choroïdien et (4) la suprachoroïde (voir figure 1.4) (Spencer, 1986; Stevens et Lowe, 1997).

À l'interface entre la choroïde et l'EPR, se trouve la membrane de Bruch (lamina vitrea), qui renferme entre autres la membrane basale de l'EPR, une couche interne de fibres de collagène, une couche de fibres élastiques, une couche externe de fibres de collagène et la membrane basale des cellules endothéliales de la couche choriocapillaire. C'est une structure dense et solide qui tend à résister à l'extension des tumeurs

choroïdiennes dans la rétine et à l'extension des tumeurs rétinienues dans la choroïde. Cependant, les mélanomes choroïdiens peuvent fréquemment briser la membrane de Bruch et prendre la configuration d'un champignon (voir figure 1.8, section 1.2.1.1) (Shields et Shields, 1992).

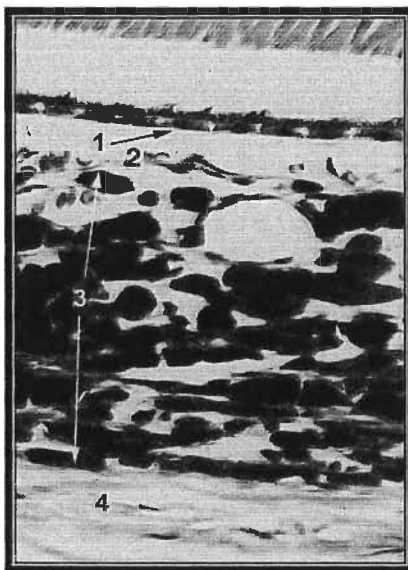


FIGURE 1.4: Coupe histologique de la choroïde. Image tirée du site Internet <http://www.louisville.edu>. (1) membrane de Bruch; (2) couche de choriocapillaires; (3) stroma choroïdien; (4) suprachoroïde.

La couche de choriocapillaires est une monocouche de capillaires organisés de manière lobulaire (voir figure 1.5) autour d'artérioles nourricières centrales dérivées du stroma choroïdien. Les choriocapillaires possèdent un des plus grands diamètres de tout le corps. Leur rôle est d'irriguer l'EPR et les couches externes de la rétine, les nutriments passant à travers les jonctions fenestrées des cellules endothéliales.

Le stroma choroïdien ou couche des vaisseaux est un tissu de soutien lâche composé de collagène, de fibriline, de réticuline, dans lequel cheminent les vaisseaux sanguins artériels et veineux, ces derniers étant en plus grand nombre. Le diamètre des artères diminue lorsqu'elles approchent de la couche de choriocapillaires. Cette couche est elle-même subdivisée en trois régions: la couche de Haller qui renferme les vaisseaux de grand diamètre de la couche la plus externe (surtout des veines), la couche de Sattler qui est composée des vaisseaux plus petits de la couche médiane (surtout des petites

veines et des artérioles) et enfin, la couche des vaisseaux composant les hémangiomes caverneux bénins de la choroïde (Shields et Shields, 1992).

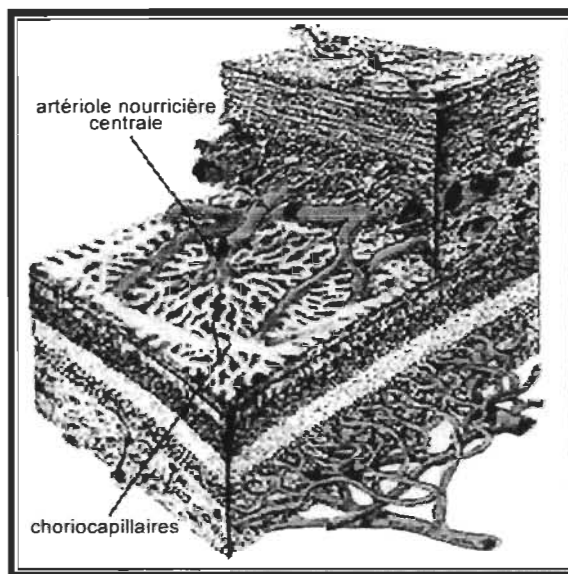


FIGURE 1.5: Organisation lobulaire des choriocapillaires. Image tirée du site Internet <http://www.trinity.edu>.

La suprachoroïde (lamina fusca) renferme des fibres élastiques et de collagène, des fibroblastes, ainsi que des mélanocytes. Elle est traversée par les veines vortex, les artères et les nerfs ciliaires (di Fiore, 1988).

1.1.2.2 Les mélanocytes choroïdiens

Le mélanocyte dérive d'une cellule souche, le mélanoblaste, qui provient des crêtes neurales suite à la fermeture du tube neural. Les cellules des crêtes neurales évoluent différemment suivant qu'elles appartiennent à la région de la tête ou du tronc (Le Moigne et Foucrier, 2001). Ceci pourrait expliquer les différences entre les mélanomes uvéal et cutané (voir section 1.2.4 pour plus de détails).

Au niveau de la choroïde, les mélanocytes sont organisés en réseau tridimensionnel de feuillets parallèles. Ils sont caractérisés par une morphologie

dendritique (voir figure 1.6) et la présence d'un organite particulier, le mélanosome (voir figure 1.7), au sein duquel se réalise la synthèse d'un pigment brun foncé, la mélanine, qui donne la couleur caractéristique au tissu choroïdien. Au stade mature, leurs mélanosomes sont ovales et pigmentés de manière homogène (stade IV, voir figure 1.7D). Ces cellules sont pourvues de petits réticulums endoplasmiques et d'appareils de Golgi et d'une quantité moindre de mitochondries, suggérant ainsi une faible activité métabolique (Boissy, 1988). Contrairement aux mélanocytes cutanés, les mélanocytes uvéaux ne synthétisent plus *de novo* la mélanine et leurs mélanosomes ne seront jamais transférés à l'extérieur de la cellule. Ils ne prolifèrent pas et sont relativement immobiles dans le stroma de la choroïde; ils sont en dormance métabolique durant toute la vie de l'individu (Boissy, 1988). Ainsi, lorsqu'il y a prolifération de ces cellules suivant leur transformation, il y a développement d'un nevus ou d'un mélanome (le mélanome uvéal sera décrit à la section 1.2) (Shields et Shields, 1992).



FIGURE 1.6: Les mélanocytes choroïdiens. Image tirée de Hu *et al.* (1993a).

Il existe quatre stades de maturation du mélanosome (voir figure 1.7):

Stade I. Prémélanosome sous forme de vésicule intracytoplasmique sphérique contenant des filaments internes et des microgranules.

Stade II. Prémélanosome ovoïde ou ellipsoïde contenant des filaments internes en zigzag.

Stade III. Mélanosome partiellement pigmenté avec des dépôts variables de mélanine.

Stade IV. Mélanosome mature rempli de mélanine, sans filament interne.

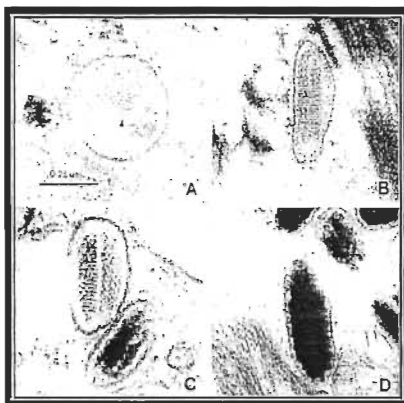


FIGURE 1.7: Les différents stades de maturation du mélanosome. Image tirée du site Internet <http://www.euronet.nl>. (A) mélanosome immature, stade I; (B) mélanosome, stade II; (C) mélanosome, stade III; (D) mélanosome mature, stade IV.

Grâce à la mélanine, les mélanocytes neutralisent la formation d'images parasites provenant de phénomènes de réflexion intraoculaire et protègent les autres types cellulaires du rayonnement solaire (Boissy, 1988). La mélanine pourrait également servir de filtre antitoxique en fixant certains produits nocifs pour les relâcher ensuite à des doses non toxiques dans la circulation sanguine (Larsson, 1993).

1.2 LE MÉLANOME UVÉAL

La plupart des mélanomes naissent de la transformation de mélanocytes cutanés. Toutefois, leur second site d'apparition par ordre d'importance se situe au niveau du tractus uvéal de l'œil où l'on retrouve également une abondance de mélanocytes originant des crêtes neurales. Un exemple de mélanome uvéal est montré à la figure 1.8.

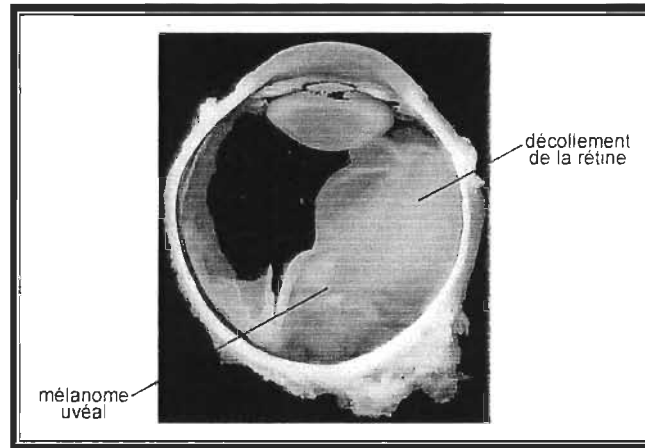


FIGURE 1.8:Coupe sagittale d'un mélanome uvéal. Image tirée du site Internet <http://www.md.huji.ac.il>.

1.2.1 Épidémiologie, facteurs pronostics et traitement du mélanome uvéal

La cause spécifique du développement d'un mélanome uvéal est encore inconnue et malheureusement dans la plupart des cas diagnostiqués, le mélanome uvéal a déjà débuté sa dissémination au moment du traitement de la tumeur primaire.

1.2.1.1 Épidémiologie et facteurs prédisposants au mélanome uvéal

Plusieurs facteurs auraient un impact important sur l'incidence de ce cancer dont l'âge, la race, le lieu géographique, les maladies congénitales, la génétique, l'environnement et les caractéristiques de la tumeur.

1.2.1.1.1 Facteurs prédisposants au mélanome uvéal

L'âge. Malgré l'observation d'un cas de mélanome uvéal chez un nouveau-né, ces tumeurs sont rarement rencontrées chez les enfants ou les jeunes adultes. Les deux tiers des patients traités par énucléation ont en moyenne entre 50 et 60 ans (Egan et al., 1988).

Le pronostic à court terme (5 ans) pour les jeunes patients (< 20 ans) est meilleur que celui des adultes, mais le pronostic à long terme (15 ans) est similaire (Barr et al., 1981; Singh et al., 2000).

La race. Tous les groupes raciaux non Caucasiens ont une incidence plus basse de mélanome uvéal que les Caucasiens. L'incidence annuelle chez les Caucasiens est de 6 à 8 nouveaux cas par million de Caucasiens, mais cette incidence est 15 à 50 fois inférieure chez les Africains et les Asiatiques (Egan et al., 1988). Toutefois, les individus appartenant aux populations non Caucasiennes sont atteints plus jeunes et le pronostic est plus inquiétant que chez les Caucasiens (Black et Wiggins, 1985; Gutman et al., 1993; Hudson et al., 1994).

Les facteurs géographiques. Ce type de tumeur est très rare en Afrique et moins fréquent en Asie et en Amérique Latine qu'en Europe et en Amérique du Nord. L'incidence est plus élevée dans les pays Scandinaves où les blonds aux yeux bleus sont majoritaires. Une exposition excessive au soleil ne semble pas jouer le même rôle pathologique que dans le développement du mélanome cutané. Aussi, si l'exposition solaire était un facteur pathologique significatif, nous devrions observer une plus grande fréquence de mélanome uvéal au niveau de l'iris comparativement au corps ciliaire et à la choroïde car, durant l'exposition à une lumière éblouissante, la pupille se contracte exposant ainsi une plus grande surface de l'iris aux rayons solaires. La distribution du mélanome uvéal dans le tractus uvéal est cependant tout autre : la proportion de tumeurs de l'iris (5%) étant moindre que celles du corps ciliaire (15%) ou de la choroïde (80%) (Li et al., 2000). Cependant, il existe des rapports contradictoires à ce sujet (Jensen, 1963; Egan et al., 1988).

Les facteurs d'origine congénitale. Trois à 20% de la population a au moins un nevus choroïdal. Cependant, seulement une minorité de nevi (1/15 000) se transforme en mélanome malin annuellement (Spencer, 1986). Une augmentation congénitale du nombre de mélanocytes (mélanocytoses congénitales oculaire et oculodermique (nevus de Ota)), est plus courante chez les personnes atteintes de mélanome uvéal que dans la

population en général (Egan et al., 1988). Le risque de développer un mélanome uvéal chez les patients souffrant de mélanocytose oculaire est de 1/400 (Singh et al., 1998). Enfin, la présence de nevi dysplastiques cutanés (lésions cutanées de 5-15 mm de diamètre dont le contour est irrégulier) n'augmente pas seulement les risques de développer un mélanome uvéal, mais elle peut aussi être associée au phénotype épithélioïde, un indicateur traditionnel de mauvais pronostic (Hammer et al., 1996).

Les facteurs d'origine génétique. Il y a une légère prédominance du mélanome uvéal chez les hommes, mais la raison de cette prédominance est inconnue (Egan et al., 1988). Il n'existe également aucune évidence d'hérédité familiale, les cas familiaux représentant à peine 0,6% des cas (Singh et al., 1996a; van Hees et al., 1998). Les gènes impliqués dans le développement et la progression du mélanome uvéal sont encore inconnus. Cependant, de fréquentes variations chromosomiques ont été observées sur les chromosomes 1 (délétion), 3 (monosomie), 6 (altérations structurales) et 8 (gain sur le bras long) (Prescher et al., 1990; Sisley et al., 1992; Aalto et al., 2001). Récemment, une analyse de la délétion partielle des bras long et court du chromosome 3 a permis de soupçonner la présence d'un gène suppresseur de tumeur au niveau des loci 3q24-q26 et 3p25 (Tschencher et al., 2001). Enfin, il y a une légère augmentation des risques de développer un mélanome uvéal chez les personnes à pigmentation pâle au niveau cutané, capillaire et iridien (Jensen, 1963; Holly et al., 1990; Regan et al., 1999). Les patients atteints de mélanome uvéal dont les iris sont bleus ou gris ont 2 à 3 fois plus de risques de mourir d'un mélanome uvéal métastatique que les patients aux iris bruns (Regan et al., 1999; Guenel et al., 2002).

Les facteurs environnementaux. Une exposition industrielle à des produits chimiques oncogéniques pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse du mélanome uvéal. Par exemple, plusieurs cas de cancers oculaires ont été répertoriés chez des employés de l'usine chimique de la compagnie Dupont-Belle en Virginie. Les épidémiologistes responsables de cette enquête ont cependant été incapables de déterminer la cause de ces nombreux cas (Spencer, 1986). Ensuite, il n'existe aucune corrélation avec l'exposition aux UV naturels, mais il y aurait une corrélation avec l'exposition aux UV artificiels

(soudure) (Guenel et al., 2002). Par exemple, les soudeurs seraient plus sujets à développer un mélanome uvéal que les pêcheurs. Les auteurs de cette étude suggèrent que la présence des UVC dans les sources d'UV artificiels serait l'élément responsable de la forte incidence de mélanomes uvéaux chez les soudeurs.

Les facteurs reliés à la tumeur. Les tumeurs antérieures localisées dans le corps ciliaire sont souvent reliées à une augmentation de la mortalité spécifique au mélanome (Shammas et Blodi, 1977; Li et al., 2000). Les mélanomes du corps ciliaire ont 1,6 à 2,3 fois plus de chance de donner naissance à des métastases que les tumeurs choroïdiennes (Li et al., 2000). Les mélanomes iridiens métastasent rarement et leur mortalité reportée sur 10 ans est seulement de 5% (Shields et al., 2001). La taille de la tumeur influence également le pronostic : la mortalité spécifique au mélanome uvéal reportée sur 10 ans est de 60% pour les grosses tumeurs (> 15 mm), alors qu'elle est seulement de 10-15% pour les petites tumeurs (≤ 10 mm) (Shammas et Blodi, 1977; The COMS Group, 1997). Le type cellulaire qui constitue la tumeur influence aussi le pronostic ; un plus grand potentiel de malignité des cellules épithélioïdes a été démontré dans différentes études (McLean et al., 1977; McLean et al., 1982; Seddon et al., 1983). Récemment, certaines études ont révélé que plusieurs mélanomes uvéaux co-expriment la vimentine (typique chez les mélanocytes) et les cytokératines 8/18 (typiques chez les carcinomes), deux molécules de la famille des filaments intermédiaires. Ce phénomène de coexpression s'appelle l'interconversion phénotypique (Fuchs et al., 1992). La coexpression de ces deux types de filaments intermédiaires semble conférer aux cellules les caractéristiques des deux types cellulaires. Ces nouvelles propriétés seraient responsables de l'augmentation du potentiel invasif et tumorigène démontré par ces cellules (Chu et al., 1996). Ainsi, les cellules du mélanome uvéal qui expriment ces deux filaments intermédiaires ont une capacité d'invasion six fois plus grande que les cellules qui expriment seulement la vimentine (Hendrix et al., 1998). Ensuite, la morphologie des réseaux microvasculaires a été corrélée avec les mélanomes du corps ciliaire de nature plus agressive (Prescher et al., 1990; Rummelt et al., 1995). Il existe neuf types de patron microvasculaire: le patron normal qui renferme des vaisseaux choroïdiens normaux non comprimés, le patron silencieux qui ne contient pas de vaisseaux

tumoraux, le patron droit qui comprend des vaisseaux droits orientés qui ne sont pas reliés entre eux, le patron parallèle qui inclut des vaisseaux droits qui sont organisés de façon parallèle les uns par rapport aux autres, le patron parallèle avec liaisons qui contient des vaisseaux parallèles avec des liens entre eux, le patron avec arcs seuls ou arcs avec branchements qui sont des vaisseaux courbes qui ne forment pas de boucles, le patron en boucle qui consiste en des vaisseaux complètement fermés et le patron en réseau qui est composé d'au moins trois boucles fermées consécutives (Folberg et al., 1992). Les patients qui survivent plus de 15 ans possèdent plus fréquemment les patrons normal et silencieux que les patients qui décèdent de métastases du mélanome uvéal. En fait, les patients qui décèdent des suites du mélanome uvéal ont plus fréquemment les patrons parallèle, parallèle avec liaisons, en boucle et en réseau que les patients qui survivent plus longtemps (Rummelt et al., 1994). Contrairement à l'angiogenèse tumorale traditionnelle où les nouveaux vaisseaux sont formés à partir de ceux préexistants par la prolifération des cellules endothéliales, les cellules tumorales des mélanomes uvéal et cutané sont capables de former des patrons microvasculaires sans la présence de cellules endothéliales (Maniotis et al., 1999). Ce concept de formation de vaisseaux sanguins sans cellules endothéliales est appelé mimétisme vasculogénique. Une grande densité microvasculaire augmenterait les risques de décès à la suite du développement de métastases (Weidner, 1995).

1.2.1.2 Traitement du mélanome uvéal

La plupart des personnes atteintes souffrent des symptômes suivants : vision embrouillée, perte du champ visuel, photopsie (perception d'éclairs, de lumières, d'étincelles) et douleur (plus rare). Cependant, 10-30% des mélanomes uvéaux sont diagnostiqués durant un examen ophtalmologique de routine en absence des symptômes mentionnés précédemment (Ah-Fat et al., 1998). L'ophtalmoscopie indirecte est d'ailleurs couramment utilisée pour diagnostiquer ce type de tumeur (Shields et al., 1991). Le mélanome uvéal est traité depuis des décennies par énucléation. Cependant, à partir des années 1970, des méthodes de traitement conservatrices comme la

brachythérapie avec plaque, l'irradiation avec particules chargées et la résection locale trans-sclérale sont devenues des pratiques plus courantes (Shields et al., 1996; Finger, 1997). Même si aucune différence convaincante au niveau de la survie a été mise en évidence entre la chirurgie radicale et les thérapies conservatrices, les avantages fonctionnels, psychologiques et cosmétiques reliés à la préservation de l'œil atteint ont davantage favorisé les dernières (Seddon et al., 1985; Augsburger et al., 1998; Char et al., 1998; Augsburger et al., 1999; Seregard, 1999; Li et al., 2000). Malheureusement, dans la plupart des cas, le mélanome uvéal a déjà débuté sa dissémination au moment du début du traitement de la tumeur primaire ; à ce stade, le choix entre la thérapie radicale et les thérapies conservatrices n'a pas nécessairement un grand impact sur la survie (Eskelin et al., 2000).

1.2.2 Classification cytologique du mélanome uvéal

Les mélanomes uvéaux sont classés histologiquement en trois types : ceux constitués de cellules fusiformes, ceux constitués de cellules épithélioïdes (voir figure 1.9) et ceux constitués d'un mélange de ces deux types de cellules (Spencer, 1986).

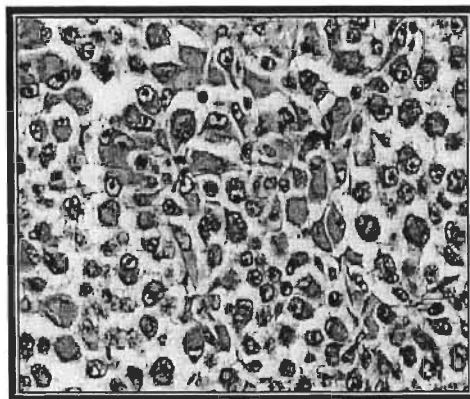


FIGURE 1.9: Les cellules épithélioïdes. Image tirée du site Internet <http://www.moffitt.usf.edu>.

Le terme épithélioïde dérive du terme épithélial et est utilisé à la place de celui-ci lors de la caractérisation de cellules cancéreuses. Les cellules épithélioïdes sont les plus

agressives, tandis que les tumeurs composées seulement de cellules fusiformes sont moins enclines à développer des métastases.

1.2.3 La propagation métastatique du mélanome uvéal

Le degré élevé de vascularisation de la choroïde et l'absence de circulation lymphatique intraoculaire permet d'expliquer le potentiel élevé de dispersion hématogénique que manifeste ce cancer. En effet, plus de 50% des patients chez lesquels on a diagnostiqué la présence d'un mélanome uvéal développeront des métastases dans divers organes dans les cinq années qui suivront en dépit d'un bon contrôle du néoplasme primaire (voir tableau 1.1). Chez 97% des patients porteurs d'un mélanome uvéal, le site initial de formation des métastases est le foie (voir tableau 1.1). L'atteinte de cet organe représente la principale cause de décès, soit 90% des individus. C'est seulement lorsque la paroi sclérale antérieure est brisée que les cellules tumorales ont accès aux vaisseaux lymphatiques de la conjonctive leur permettant de se disséminer dans les ganglions lymphatiques locaux, ce qui autrement est rarement observé lors d'un mélanome uvéal (Dithmar et al., 2000). Le mélanome uvéal est une maladie incurable, le diagnostic de métastases hépatiques étant généralement associé à une espérance de vie variant de 2 à 7 mois (Egan et al., 1988).

Le diagnostic des métastases se fait à l'aide des tests de fonction du foie et de l'examen de la poitrine aux rayons X (Albert et al., 1992). Cependant, l'ultrasonographie abdominale et la tomographie sont des méthodes plus sensibles pour la détection de métastases (Eskelin et al., 1999). Les méthodes utilisées pour le traitement des métastases du mélanome sont la chimiothérapie et la chimioembolisation de l'artère hépatique avec ou sans interféron. Ces deux méthodes permettent d'allonger la survie des patients d'environ 12 mois ; plus de 20% des métastases régressent durant le traitement, du moins partiellement, mais la maladie finit toujours par progresser et tuer le patient (Albert et al., 1992; Pyrhonen et al., 1992; Leyvraz et al., 1997; Pyrhonen, 1998).

TABLEAU 1.1

Sites des métastases des mélanomes uvéaux de la choroïde et du corps ciliaire

Organes	Pourcentage (%)
Foie seulement	34
Foie et autres organes*	63
Autres organes seulement	3
	100

*Organes autres que le foie :

Poumons, cœur, tractus gastro-intestinal, ganglions lymphatiques, pancréas, peau, système nerveux central, os, rate, glandes adrénales, reins, ovaires, thyroïde, vésicule biliaire, aorte.

Tiré de Spencer (1986)

1.2.4 Comparaison entre les mélanomes uvéal et cutané

Le mélanome uvéal diffère grandement du mélanome cutané, même si les deux types de tumeurs ont comme origine cytologique les mélanocytes (Spencer, 1986; Mckee, 1989). Dans le mélanome uvéal, la lumière UV et l'hérédité ont un faible ou aucun impact sur le développement de la tumeur comparativement au mélanome cutané (Egan et al., 1988; Mckee, 1989; Singh et al., 1996a; Platz et al., 2000). Le mélanome intraoculaire se dissémine par la circulation sanguine, car l'intérieur de l'œil ne contient pas de vaisseaux lymphatiques et il a une grande propension au développement de métastases distantes, en particulier au foie, alors que le mélanome cutané tend à se propager dans les ganglions lymphatiques régionaux (Einhorn et al., 1974; McLean, 1993; Eskelin et al., 1999; Clarijs et al., 2001). Plusieurs études récentes ont révélé de très grandes différences cytogénétiques et moléculaires entre ces deux tumeurs, ce qui explique probablement leur comportement biologique divergent (Bittner et al., 2000; Cree, 2000; Naus et al., 2000). Ces différences incluent :

Les différences immunophénotypiques. L'anticorps S-100 marque fortement le mélanome cutané, contrairement au mélanome uvéal où le marquage est faible et

variable. Le marqueur p75NTR (*p75 neutrophin receptor*), connu pour aider à différencier les cellules fusiformes des cellules épithélioïdes dans le mélanome cutané ne marque pas le mélanome uvéal. Il est possible que le marquage de p75NTR reflète la présence de desmoplasie, un élément courant dans le mélanome cutané composé de cellules fusiformes, mais qui est rarement présent dans le mélanome uvéal (Iwamoto et al., 2002). Les marqueurs NKI-C3 (*melanoma marker CD63 clone NKI/C3*), HMB45 (*melanoma marker clone HMB45*), HMB50 (*melanoma marker clone HMB50*), tyrosinase, melan-A (*melanoma antigen*) et MIFT (*microphthalmia transcription factor*) marquent tous fortement le mélanome uvéal, mais pas le mélanome cutané (Iwamoto et al., 2002).

L'expression des cadhérines. Les mélanocytes cutanés normaux expriment la cadhérine E contrairement aux cellules de nevi ou aux mélanomes cutanés. Cependant, les cellules du mélanome cutané expriment fortement la cadhérine N (Hsu et al., 1996). Lors d'études précédentes, un réarrangement du phénotype des cadhérines de l'isoforme E à l'isoforme N a été observé durant la progression du mélanome cutané (Hsu et al., 1996; Sanders et al., 1999). Dans le mélanome uvéal, la cadhérine E est exprimée de façon variable, alors que la cadhérine N est absente (Anastassiou et al., 2002).

L'expression des intégrines. Contrairement au mélanome cutané, la détermination du profil d'expression des intégrines ne permet pas de catégoriser les mélanomes uvéaux selon leur pouvoir invasif ou leur type cellulaire (ten Berge et al., 1993). Dans le mélanome uvéal, la sous-unité $\alpha 5$ a été détectée dans toutes les tumeurs, mais seulement un petit nombre étaient positives pour la sous-unité $\alpha 2$, tandis que le résultat était inversé pour le mélanome cutané. Une autre étude a démontré la présence de la sous-unité $\alpha 5$ dans les tumeurs primaires du mélanome uvéal, mais à des niveaux modérés (Beliveau et al., 2000; Beliveau et al., 2001). La sous-unité $\beta 4$ n'est pas détectée dans le mélanome uvéal, mais elle est présente chez un petit nombre de mélanomes cutanés. Enfin, dans le mélanome cutané, l'intégrine $\alpha \nu \beta 3$ est exprimée dans les métastases et durant la phase verticale de croissance des tumeurs primaires, alors que, dans le mélanome uvéal, $\alpha \nu \beta 3$ est absente dans les tumeurs primaires, mais

présente dans les métastases. C'est plutôt $\alpha\beta 5$ qui est exprimée dans les mélanomes uvéaux primaires (Albelda et al., 1990; ten Berge et al., 1993).

La présence de lymphocytes. Dans le mélanome cutané, à l'opposé du mélanome uvéal, la présence de lymphocytes dans la tumeur est de bon augure (Folberg et al., 1993). En principe, les lymphocytes n'ont pas accès à la choroïde à moins d'avoir été activés en périphérie par un antigène spécifique. La présence de lymphocytes dans la tumeur uvéale pourrait provenir d'un premier contact des lymphocytes avec des cellules issues de la tumeur primaire qui sont présentes dans la circulation générale (Mooy et De Jong, 1996).

Les altérations génétiques. Des mutations somatiques du gène PTEN (*phosphatase and tensin homologue*) ont été détectées dans plus de 40% des lignées cancéreuses dérivées de mélanomes cutanés (Guldborg et al., 1997). Cependant, dans les lignées cancéreuses dérivées de mélanomes uvéaux, aucune perte, altération structurale ou mutation somatique du gène PTEN n'a été retrouvée. Même si, dans la presque totalité des mélanomes cutanés, l'implication du gène CDKN2 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2a*) a été postulée (Walker et al., 1998), des mutations et délétions de CDKN2 sont rarement observées dans les lignées cancéreuses et les tumeurs primaires du mélanome uvéal (Singh et al., 1996b). Les anomalies chromosomiques typiques retrouvées chez le mélanome uvéal, comme la perte du chromosome 3 ou les gains sur le chromosome 8q sont rarement observées dans le mélanome cutané (Sisley et al., 1992). Dans le mélanome cutané, c'est plutôt les chromosomes 10 (monosomie) (Robertson et al., 1999) et 20 qui comportent des anomalies (chromosomes supplémentaires) (Barks et al., 1997).

À la lumière de ces différences, ces deux types de mélanomes doivent être considérés comme deux pathologies distinctes. Ainsi, les données existantes sur le mélanome cutané ne sont pas nécessairement applicables au mélanome uvéal, d'où la nécessité de développer des modèles spécifiques au mélanome uvéal.

1.3 LES INTÉGRINES

La plupart des processus cellulaires physiologiques et pathologiques nécessitent un contact entre les cellules ou entre les cellules et la matrice extracellulaire (MEC). Au cours du processus invasif, les cellules métastatiques doivent adhérer à la membrane basale, se déplacer dans le milieu interstitiel adjacent, envahir les vaisseaux sanguins, s'attacher aux cellules endothéliales du capillaire et les traverser pour aller coloniser l'organe cible. Ces étapes sont modulées, entre autres, par les molécules d'adhésion cellulaire qui régissent les différentes phases de contact et les communications qu'établissent les cellules entre elles. Quatre familles sont regroupées au sein de ce groupe de molécules : les cadhérines, les sélectines, les immunoglobulines et les intégrines.

1.3.1 Structure et fonctions des intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires, composées de deux sous-unités, α et β (voir figure 1.10), associées de façon non covalente, qui font le pont entre le cytosquelette et la MEC. Elles sont responsables de l'interaction et de l'adhésion cellule-cellule, de la liaison avec les constituants de la membrane basale (e.g. collagène et laminine) et de la liaison avec les protéines de la MEC (e.g. fibronectine, fibrinogène, laminine, thrombospondine et vitronectine). Elles sont également impliquées dans l'embryogenèse, l'agrégation plaquettaire, les fonctions immunitaires, l'inflammation, la réparation tissulaire, l'invasion tumorale et quelques maladies se développant à la suite de mutations de gènes d'intégrines (Goldschild et Baudouin, 1997).

Il existe dix-huit sous-unités α et huit sous-unités β dont les différentes combinaisons donnent naissance à plus de vingt-quatre intégrines (voir tableau 1.2) (Hynes, 1992; Shimaoka et al., 2002). Cependant, suivant l'analyse du génome humain, cinq autres sous-unités α et une autre sous-unité β s'ajouteraient à cette famille (Venter et al., 2001).

Cette grande diversité de récepteurs permet à la cellule de recueillir de l'information sur la composition de la matrice et de la convertir ensuite en signaux cellulaires (adhésion, migration, prolifération, différenciation).

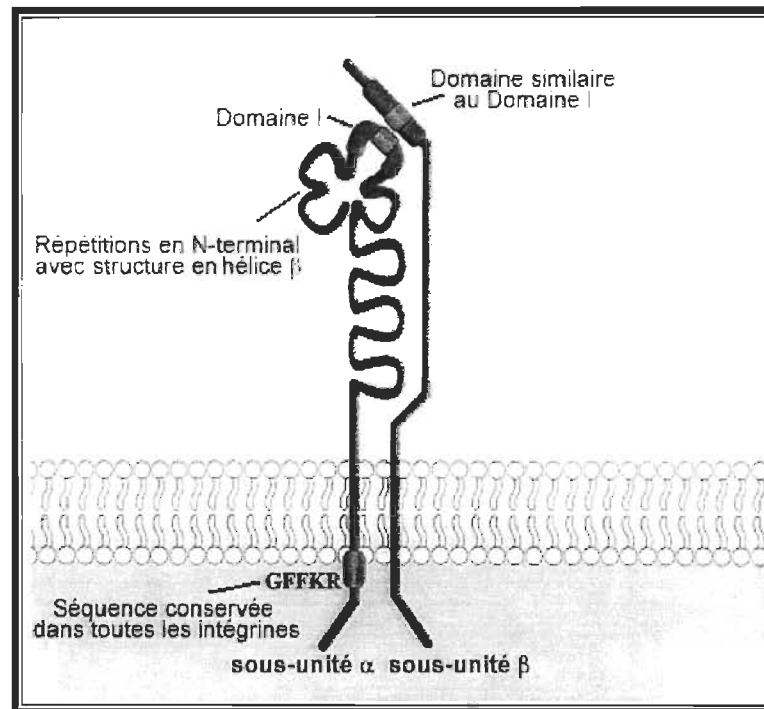


FIGURE 1.10: Structure d'une intégrine. Image tirée du site Internet <http://www.hsc.virginia.edu>.

Les sous-unités des intégrines ont un long domaine extracellulaire (700-1100 acides aminés) et un court domaine cytoplasmique (environ 50 acides aminés). Une exception notable est la sous-unité $\beta 4$ qui possède un domaine cytoplasmique comprenant plus de 1000 acides aminés (Humphries, 2000).

La liaison des ligands se fait au niveau de la tête globulaire. La majorité des intégrines ne sont pas spécifiques à un seul ligand, mais peuvent en lier un ou plusieurs et ce, avec différentes affinités. La spécificité intégrine-ligand est déterminée largement par la chaîne α (voir tableau 1.2).

TABLEAU 1.2
Les intégrines et leurs ligands

Intégrines	Ligands
$\alpha 1\beta 1$	Collagène, laminine, té nascine
$\alpha 2\beta 1$	Collagène, laminine, fibronectine, cadhérine E, é chovirus 1
$\alpha 3\beta 1$	Fibronectine, laminine, collagène, épiligrine, kalinine, entactine
$\alpha 4\beta 1$	Fibronectine, VCAM-1 ¹ , MAdCAM-1 ² , thrombospondine, facteur de von Willebrand, ostéopontine, éristostatine
$\alpha 5\beta 1$	Fibronectine, murine L1, invasine, collagène
$\alpha 6\beta 1$	Laminine, invasine, mérosine, kalinine
$\alpha 7\beta 1$	Laminine
$\alpha 8\beta 1$	Fibronectine, té nascine, vitronectine, ostéopontine
$\alpha 9\beta 1$	Té nascine
$\alpha 10\beta 1$	Collagène, laminine
$\alpha 11\beta 1$	Collagène
$\alpha v\beta 1$	Vitronectine, fibronectine, collagène, facteur de von Willebrand, fibrinogène
$\alpha D\beta 2$	VCAM-1, ICAM-3 ³
$\alpha X\beta 2$	C3bi, fibrinogène, fibronectine, facteur de von Willebrand
$\alpha L\beta 2$	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
$\alpha M\beta 2$	C3bi, fibrinogène, facteur X, ICAM-1
$\alpha v\beta 3$	Vitronectine, fibrinogène, laminine, ostéopontine, facteur de von Willebrand, fibronectine, collagène, PE-CAM-1 ⁴ , L1 humaine, thrombospondine, sialoprotéine d'os, té nascine, désintégrine, protéine Tat du VIH ⁵
$\alpha IIb\beta 3$	Vitronectine, thrombospondine, fibronectine, facteur de von Willebrand, facteur VIII, ostéopontine, fibrinogène, collagène, désintégrine
$\alpha 6\beta 4$	Laminine, kalinine, mérosine
$\alpha v\beta 5$	Vitronectine, fibronectine, fibrinogène, protéine Tat du VIH
$\alpha v\beta 6$	Fibronectine, té nascine
$\alpha 4\beta 7$	Fibronectine, MAdCAM-1, VCAM-1, addressine, <i>Peyer's patch high endothelial venules</i>
$\alpha E\beta 7$	cadhérine E
$\alpha v\beta 8$	Fibronectine, laminine, collagène

(Cheresh et Mecham, 1994; Giancotti et Mainiero, 1994; Denda et al., 1998; Tulla et al., 2001; Whittard et al., 2002)

¹*Vascular cell adhesion molecule*

²*Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule*

³*Intercellular adhesion molecule*

⁴*Platelet endothelial cell adhesion molecule*

⁵Virus d'immunodéficience humaine

1.3.1.1 Structure de la sous-unité α

Domaine en hélice β . La région N-terminale de la sous-unité α contient sept segments d'environ 60 acides aminés chacun ayant une faible homologie entre eux, lesquels se replient en sept feuillets β pour former un domaine à motif hélice β (voir figure 1.11) (Springer, 1997). La sous-unité β contient un domaine à motif hélice β avec la même topologie. Des études de mutagenèse ont démontré que les acides aminés liant le ligand sont regroupés dans le domaine à motif hélice β (Kamata et al., 2001). La moitié des sous-unités α ne contiennent pas de domaine I (voir ci-dessous). Dans ces intégrines, le domaine à motif hélice β semble participer directement à la liaison du ligand (Humphries, 2000). Pour les intégrines qui contiennent le domaine I, le domaine à motif hélice β peut coopérer à la liaison de certains ligands comme dans le cas de αM (Yalamanchili et al., 2000) ou jouer aucun rôle direct comme dans le cas de αL (Lu et al., 2001).

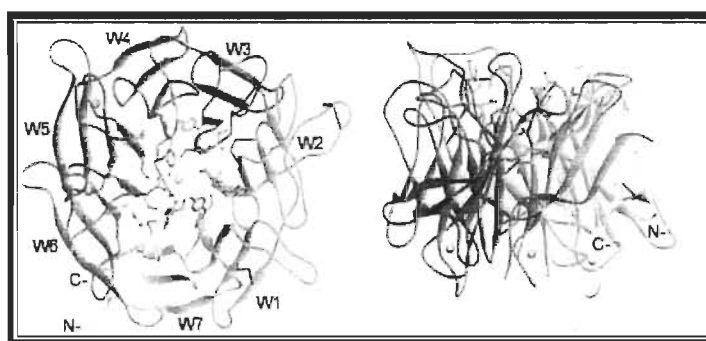


FIGURE 1.11: Domaine en hélice β des intégrines. Image tirée du site Internet <http://cbr.med.harvard.edu>.

Domaine I. La moitié des sous-unités α contiennent un domaine d'environ 200 acides aminés, connu sous le nom de domaine I. Le domaine I est le site majeur de liaison au ligand chez les intégrines qui contiennent ce domaine. Il est inséré entre les deuxième et troisième feuillets β du domaine à motif hélice β (Springer, 1997). La relation structurale entre les domaines I et à motif hélice β des intégrines et les sous-unités α et β des protéines G, respectivement, est intéressante et peut refléter des similarités fonctionnelles dans la régulation conformationnelle de la liaison au ligand

(Lee et al., 1995a). Un site de coordination du cation divalent désigné *Metal ion-dependent adhesion site* (MIDAS) dans le domaine I lie les acides aminés du ligand chargés négativement, de la même façon que le magnésium dans les protéines G coordonne le phosphate- γ du GTP (Shimaoka et al., 2002).

Région de la queue de la sous-unité α . La région C-terminale du domaine à motif hélice β comprend une large portion du domaine extracellulaire de la sous-unité α d'environ 500 acides aminés. La structure cristalline révèle la présence de trois domaines à motif sandwich β dans cette région, désignés *thigh*, *calf-1* et *calf-2* (Xiong et al., 2001).

1.3.1.2 Structure de la sous-unité β

Domaine PSI. La région N-terminale riche en cystéines, allant des acides aminés 1-50, montre une identité de séquence avec les protéines membranaires incluant les plexines, les sémaphorines et les récepteurs c-met ; ce domaine est appelé domaine PSI (plexine/sémaphorine/intégrine) pour les plexines, les sémaphorines et les intégrines (Bork et al., 1999). Cette région contient sept cystéines dont la première forme un long pont disulfure avec la région C-terminale de la sous-unité β qui, elle aussi est riche en cystéines. Ces régions riches en cystéines coopèrent pour maintenir l'intégrine dans sa conformation inactive (Zang et Springer, 2001).

Domaine similaire au domaine I. La sous-unité β renferme un domaine fortement conservé d'environ 240 acides aminés, s'étendant des acides aminés 100 à 340. Ce domaine contient un site DXSXS de liaison au métal similaire au MIDAS du domaine I (Lee et al., 1995b), mais une faible identité de séquence avec le domaine I. C'est pourquoi il a été nommé domaine similaire au domaine I (Ponting et al., 2000). Cette région est sensible aux mutations qui résultent en un manque d'association de la sous-unité $\beta 2$ avec les sous-unités α ou en une perte de fonction et provoque une déficience d'adhésion des leukocytes (Hogg et al., 1999). Le domaine similaire au

domaine I semble lier directement le ligand chez les intégrines sans domaine I et réguler indirectement la liaison du ligand chez les intégrines avec le domaine I.

Queue C-terminale et domaines semblables au *epidermal growth factor* (EGF).

La portion C-terminale du domaine extracellulaire s'étend des acides aminés 340 à 700. La majorité de cette portion est riche en cystéines et correspond à la queue de la sous-unité β . Parmi les acides aminés 435 à 600, il y a quatre répétitions riches en cystéines semblables aux EGF. Ils ont été désignés domaines *integrin-epidermal growth factor* (I-EGF) (Takagi et al., 2001). Cette portion de la sous-unité β est importante pour la transmission de signaux.

1.3.2 Expression des intégrines dans la choroïde et le mélanome uvéal

L'étude de la migration des cellules métastatiques issues de mélanomes uvéaux permettra de mieux comprendre les processus impliqués dans l'intravasation et l'extravasation de ces cellules et ceux impliqués dans la nidation préférentielle au foie. Au niveau moléculaire, plusieurs de ces étapes peuvent partiellement s'expliquer par la modulation de l'expression de certaines molécules d'adhésion dont les intégrines.

Il a été démontré que les sous-unités d'intégrines suivantes sont présentes dans les vaisseaux choroïdiens : $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ (Elner et Elner, 1996).

Des études immunohistochimiques effectuées sur des mélanocytes uvéaux normaux ont permis de déterminer qu'ils expriment les intégrines $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$. Cependant, les mélanocytes n'expriment pas les intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$ (Elshaw et al., 2001). Une autre étude a démontré par cytométrie de flux la présence de la sous-unité $\alpha 5$ à la surface des mélanocytes uvéaux normaux (Beliveau et al., 2000).

Des études immunohistochimiques effectuées sur des mélanomes uvéaux ont permis de déterminer que 100% des tumeurs expriment les intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$,

$\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$, alors que 70% expriment $\alpha 4\beta 1$ et 60% expriment $\alpha 6\beta 1$ (Elshaw et al., 2001). Deux autres études effectuées sur des tumeurs primaires du mélanome uvéal ont permis de déterminer que 100% des lésions sont positives pour les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$ et l'intégrine $\alpha v\beta 5$, 75% pour la sous-unité $\alpha 6$, 25% pour la sous-unité $\alpha 4$, 16% pour la sous-unité $\alpha 1$, 9% pour la sous-unité $\alpha 2$ et aucune lésion n'est positive pour la sous-unité $\beta 4$ et l'intégrine $\alpha v\beta 3$ (Albelda et al., 1990; ten Berge et al., 1993). D'autres études immunohistochimiques effectuées sur des prélèvements tissulaires issus de mélanomes uvéaux au stade primaire, ont permis de détecter les sous-unités $\beta 1$, $\beta 5$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv et, particulièrement, l'intégrine $\alpha v\beta 5$ dans toutes les tumeurs primaires (Elnér et Elnér, 1996). La majorité des tumeurs exprimaient également la sous-unité $\alpha 6$, tandis que les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 4$ étaient présentes seulement chez un faible pourcentage de mélanomes (Elnér et Elnér, 1996). Enfin, une dernière étude a démontré la présence de la sous-unité $\alpha 5$ à la surface de lignées cancéreuses de tumeurs primaires du mélanome uvéal, mais en faible quantité (Beliveau et al., 2000).

Chez les métastases, les lésions sont positives pour les sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$, entre 76% et 100% pour l'intégrine $\alpha v\beta 5$, 75% pour les sous-unités $\alpha 4$ et $\alpha 6$ et aucune lésion n'est positive pour la sous-unité $\beta 4$ (Albelda et al., 1990). Une seconde étude effectuée sur quatre mélanomes uvéaux métastatiques a démontré un profil d'expression des intégrines qui est similaire aux tumeurs primaires, excepté pour l'augmentation de l'expression des sous-unités $\alpha 2$ et $\alpha 4$ et la présence de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ dans deux des quatre métastases à l'étude, $\alpha v\beta 3$ étant absente dans les tumeurs primaires (ten Berge et al., 1993). Enfin, une autre étude a démontré une corrélation inverse entre l'expression du transcrit de la sous-unité $\alpha 4$ et le potentiel métastatique de certaines lignées de mélanomes uvéaux (Larouche et al., 1998).

1.4 OBJECTIFS DE RECHERCHE

Cette section présente en détails les objectifs à atteindre lors de ce projet de recherche.

1.4.1 Objectif global

L'objectif global de ce projet de maîtrise consistait à identifier les gènes responsables de la formation du mélanome uvéal et de la nidation spécifique des métastases au foie. Cependant, différents objectifs spécifiques ont été élaborés afin d'atteindre cet objectif global. En effet, il était d'abord nécessaire de caractériser les lignées cellulaires dérivées de tumeurs primaires et d'une métastase au foie.

1.4.1.1 Premier objectif spécifique

Le premier objectif spécifique consistait à caractériser le profil d'expression des intégrines des MCN, des lignées cancéreuses TP31 et SP8.0 dérivées de tumeurs primaires du mélanome uvéal et de la lignée hépatique H79 dérivée d'une métastase de mélanome uvéal.

1.4.1.1.1 Cytométrie de flux à l'aide d'anticorps spécifiques aux sous-unités d'intégrines

La cytométrie de flux (CF) possède une plus grande sensibilité de détection que l'immunofluorescence indirecte (IF). Ainsi, le profil d'expression des intégrines des MCN, des lignées cancéreuses TP31, SP8.0 et H79 a été déterminé à l'aide d'anticorps spécifiques à sept sous-unités α et quatre sous-unités β .

1.4.1.2 Deuxième objectif spécifique

Le deuxième objectif spécifique consistait à identifier les gènes qui sont exprimés spécifiquement par la lignée cancéreuse TP31 dérivée d'un mélanome uvéal par rapport

aux MCN. Nous avons choisi la lignée cancéreuse TP31 plutôt qu'une autre étant donné sa grande agressivité et l'absence de traitement par radiothérapie de la tumeur primaire à partir de laquelle cette lignée cancéreuse a été mise en culture.

1.4.1.2.1 Banque de soustraction « tumeur primaire (lignée TP31) – MCN »

L'utilisation de la trousse *PCR-Select cDNA Subtraction* de la compagnie *Clontech* a permis de soustraire les populations d'ARNm des MCN de celles de la lignée cancéreuse TP31 et d'amplifier les gènes qui sont spécifiquement exprimés par la tumeur primaire (lignée TP31) par rapport aux MCN. Le produit de la réaction de polymérase en chaîne (PCR) « lignée TP31 – MCN » obtenu à la fin de la soustraction est ensuite cloné pour créer une librairie de clones candidats.

1.4.1.2.2 Librairie de clones candidats spécifiques à la lignée TP31

Le clonage du produit PCR de la soustraction « lignée TP31 – MCN » dans le vecteur *pGEM-T Easy* a permis de créer une librairie de clones candidats qui sont spécifiquement exprimés par la lignée TP31. Cette librairie est ensuite utilisée pour éliminer les faux positifs présents dans la banque de soustraction à l'aide du criblage différentiel.

1.4.1.2.3 Criblage différentiel de la librairie de clones candidats à l'aide de sondes d'ADNc

La production de sondes radioactives à partir des produits PCR de la soustraction directe (« lignée TP31 – MCN »), de la soustraction inverse (« MCN – lignée TP31 ») et

de l'ADNc de la lignée TP31 et des MCN, ainsi que l'hybridation de ces sondes avec des membranes contenant les clones candidats de la librairie permet d'éliminer des faux positifs présents dans la banque de soustraction « lignée TP31 – MCN ». Les clones qui sont réellement spécifiques à la lignée TP31 sont ensuite séquencés pour permettre leur analyse bioinformatique.

1.4.1.2.4 Analyse bioinformatique des clones spécifiques à la lignée TP31

Le séquençage des clones spécifiques à la lignée TP31 et leur analyse bioinformatique a permis (1) de déterminer l'identité des protéines connues qui sont codées par ces clones, ainsi que (2) de connaître la séquence et la localisation chromosomique des clones correspondant à des *Expressed sequence tags* (ESTs) ou à des *High throughput genomic sequences* (HTGS) et enfin (3) de connaître la séquence des clones inconnus (clones absents des banques de données). La présence dans d'autres tissus et lignées cancéreuses de clones intéressants (clones inconnus ou correspondant à des ESTs ou à des HTGS) a ensuite été vérifiée par amplification PCR.

1.4.1.2.5 Amplification PCR des clones intéressants avec différents tissus normaux et lignées cancéreuses

L'utilisation de l'ADNc d'une grande variété de tissus et lignées cancéreuses permet de vérifier si les clones intéressants sont spécifiques au mélanome uvéal.

1.4.1.3 Troisième objectif spécifique

Le troisième objectif spécifique consistait à déterminer le phénotype et à confirmer l'origine mélanocytaire des cellules d'une métastase hépatique du mélanome uvéal.

1.4.1.3.1 Immunofluorescence indirecte à l'aide de marqueurs cellulaires spécifiques

L'utilisation de marqueurs spécifiques aux cellules épithéliales (cytokératines), aux cellules stromales (vimentine), au mélanome (HMB45) ou aux cellules cancéreuses hépatiques (α -fétoprotéine (AFP)) permet de déterminer le phénotype de la lignée hépatique H79, afin de s'assurer que cette lignée provient d'une métastase du mélanome uvéal.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 CULTURE CELLULAIRE DES MCN ET DES LIGNÉES CANCÉREUSES

Pour obtenir le matériel biologique nécessaire à la cytométrie de flux, à la banque de soustraction et à l'immunofluorescence, des cultures de MCN et de lignées cancéreuses doivent être établies.

2.1.1 Dissection des globes oculaires humains

La procédure décrite ici respecte les principes de la Déclaration d'Helsinki. Les globes oculaires humains utilisés proviennent de la Banque d'Yeux Nationale (Ste-Foy, Québec, Canada) et l'âge des donneurs varie entre 6 mois d'âge fœtal et 62 ans. Le protocole de dissection est une modification de la méthode de Pfeffer (1991). Le globe est d'abord immergé dans de la saline de dissection (0,03% *Bovine serum albumin* (BSA), 0,5% polyvinylpyrrolidone (PVP), 17 μ M de glutathione (GSH), 100 U/ml de pénicilline/streptomycine dans une solution de *Modified Hanks balanced salt solution* (MHBSS): 0,5 mM CaCl_2 , 8,3 mM glucose, 15 mM d'acide N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-2-éthanesulfonique (HEPES), 3,5 mM KCl, 0,27 mM MgCl_2 , 0,37 mM MgSO_4 , 138,5 mM NaCl, 4,3 mM NaHCO_3 , 1,0 mM NaH_2PO_4 , pH 7.2) pour éviter l'assèchement des structures. La sclère est alors découpée à environ 5 mm tout autour de la cornée. La cornée, l'iris, le cristallin et le vitré sont ensuite retirés et le nerf optique est découpé. Le globe restant est découpé en deux et la rétine neurale (sans l'EPR) est prélevée à l'aide de pinces stériles et congelée pour utilisation ultérieure. Ensuite, les feuillets d'EPR-choroïde sont détachés de la sclère, placés dans de la dispase (0,5 U/mg dispase II, 1% PVP, 2% sérum de poulet, 0,44 mM CaCl_2 dans du Hanks monovalent (8,3 mM glucose, 15 mM HEPES, 3,5 mM KCl, 138,5 mM NaCl,

4,3 mM NaHCO₃, 1,0 mM NaH₂PO₄, pH 7.2)) et incubés pendant 20-40 min à 37°C. À la fin de l'incubation, les feuillets d'EPR-choroïde sont retirés de la solution de dispase à l'aide de pinces stériles et transférés dans la saline de dissection pour arrêter l'action de la dispase. Les feuillets d'EPR sont ensuite décollés de la choroïde avec de petits jets de solution de dissection dirigés entre la choroïde et l'EPR à l'aide d'une pipette de plastique stérile. Les feuillets d'EPR sont congelés pour utilisation ultérieure et la choroïde est ensuite mise de côté en conditions stériles pour permettre l'isolation et la mise en culture des MCN.

2.1.2 Mise en culture des MCN et des lignées cancéreuses

Avant d'obtenir des cultures pures de MCN nécessaires aux manipulations réalisées au sein de ce projet de maîtrise, diverses étapes s'ajoutent à la dissection des globes oculaires pour permettre leur isolation.

2.1.2.1 Isolation des MCN à partir de la choroïde et leur mise en culture

Le protocole est une modification de la méthode originalement décrite par Hu *et al.* (1993a, b). La centrifugeuse *Centra-*R* et le rotor 216 (*IEC*) ont été utilisés pour toutes les étapes de centrifugation. Les feuillets de choroïde obtenus à la fin de la dissection précédente (voir section 2.1.1) sont d'abord immergés dans de la trypsine-acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) (0,5%) pendant toute la nuit à 4°C et ensuite incubés durant une heure à 37°C. Les mélanocytes sont ensuite décollés du reste de la choroïde en effectuant des aspirations successives à l'aide d'une pipette sérologique stérile. Le tout est centrifugé à 2 000 rpm durant 5 min et le culot est resuspendu dans du milieu de culture. Les MCN sont maintenus en culture dans des pétris contenant du milieu *Dulbecco's modified Eagle media (DMEM-F12; Invitrogen)*, auquel les suppléments présentés au tableau 2.1 sont ajoutés. Les cellules croissent dans

un incubateur maintenu à une température constante de 37°C avec une atmosphère de 5% en CO₂.

TABLEAU 2.1
Suppléments ajoutés au milieu de culture des MCN

Constituants	Concentration de la solution mère	Concentration finale
FBS ¹	100% (v/v)	10% (v/v)
Glutamine	200 mM	2 mM
Gentamicine	10 mg/ml	50 µg/ml
IBMX ²	4,5 mM	0,1 mM
Toxine du choléra	0,1 mg/ml	20 ng/ml
NaHCO ₃	poudre	14,3 mM
Généticine	100 mg/ml	100 µg/ml
PMA ³	200 µg/ml	62 ng/ml

¹Fetal bovine serum

²Isobutylméthylxanthine

³Phorbol-12-myristate-13-acétate

Pour obtenir le plus de cellules possible d'un même donneur, des passages sont effectués. D'abord, le milieu usé est enlevé et le pétri est rincé rapidement deux fois avec du Hanks monovalent. Par la suite, 3 ml de trypsine-EDTA 0,5% est versé dans le pétri et celui-ci est incubé pendant 5 min à 37°C. À la fin de l'incubation, 10 ml de milieu avec sérum sont ajoutés au pétri pour arrêter la réaction et le mélange est centrifugé pendant 5 min à 2 000 rpm pour obtenir un culot qui sera resuspendu dans du milieu frais et divisé dans plusieurs pétris de 100 mm de diamètre (300 000 cellules/pétri).

2.1.2.2 Isolation des lignées cancéreuses à partir d'une tumeur et leur mise en culture

La méthode de mise en culture de cellules à partir d'une tumeur est une modification du protocole décrit par Freshney (1992). La centrifugeuse *Centra-*R* et le rotor 216 (*IEC*) ont été utilisés pour toutes les étapes de centrifugation. Dans un pétri de 60 mm de diamètre, la tumeur est coupée en très petits morceaux à l'aide d'un scalpel à

lame stérile. Ces petits morceaux de tumeurs sont transférés dans un tube de 15 ml, auquel est ajouté 8 ml de milieu *DMEM-F12* et 2 000 U de collagénase. Le tube contenant les morceaux de tumeur est incubé à 37°C toute la nuit. Au matin, les morceaux sont homogénéisés par pipettage, le tout est centrifugé à 2 000 rpm pendant 5 min, puis le culot resuspendu dans du milieu de culture est versé dans un pétri qui est ensuite incubé à 37°C. Après deux jours d'incubation, la présence de cellules adhérentes est vérifiée à l'aide du microscope. Si des cellules ont adhéré et semblent proliférer, le milieu de culture est changé. Différentes lignées cancéreuses ont été utilisées lors de ce projet de maîtrise. Le tableau 2.2 renferme la description de chaque lignée et leur utilisation au sein de ce travail.

TABLEAU 2.2
Lignées cancéreuses utilisées

Lignée	Type de cancer	Donneur	Phénotype	Utilisation
HeLa	col de l'utérus	féminin, 31 ans	épithélioïde	CF ¹ RT-PCR ²
HepG2	carcinome hépatocellulaire	masculin, 15 ans	épithélioïde	IF ³
H79	métastase au foie du mélanome uvéal	féminin, 76 ans	? ⁴	CF RT-PCR IF
Jurkat	leucémie lymphoblastique aiguë	masculin, 14 ans	épithélioïde	CF RT-PCR
SP6.5	tumeur primaire du mélanome uvéal	féminin, 77 ans	mixte	RT-PCR IF
SP8.0	tumeur primaire du mélanome uvéal	masculin, 48 ans	mixte	CF RT-PCR IF
TP31	tumeur primaire du mélanome uvéal	masculin, 62 ans	mixte	BS ⁵ CF RT-PCR IF

¹Cytométrie de flux

²*Reverse transcription-polymerase chain reaction*

³Immunofluorescence indirecte

⁴Phénotype non caractérisé

⁵Banque de soustraction

Les lignées cancéreuses SP6.5, SP8.0 et TP31 proviennent du laboratoire du Dr Guy Pelletier (Unité de recherche en rhumatologie et immunologie, pavillon CHUL, Université Laval, Québec), la lignée hépatique H79 provient du laboratoire du Dr Sylvain Guérin (Unité de recherche en endocrinologie moléculaire et oncologique, pavillon CHUL, Université Laval, Québec) et les lignées cancéreuses HeLa (#CCL-2), HepG2 (#HB-8065) et Jurkat (#TIB-152) proviennent de l'ATCC.

Les lignées cancéreuses HeLa, H79, SP6.5, SP8.0 et TP31 sont maintenues en culture dans des pétris contenant du milieu *DMEM-F12*, auquel les suppléments du tableau 2.3 sont ajoutés, tandis que la lignée cancéreuse Jurkat est maintenue en suspension dans des pétris contenant du milieu *Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640; Invitrogen)*, auquel les suppléments du tableau 2.3 sont ajoutés. Les cellules croissent dans un incubateur maintenu à une température constante de 37°C avec une atmosphère de 5% en CO₂.

La lignée cancéreuse HepG2 est maintenue en culture dans des pétris contenant du milieu *DMEM low glucose (Invitrogen)*, auquel les suppléments du tableau 2.4 sont ajoutés. Les cellules croissent dans un incubateur maintenu à une température constante de 37°C avec une atmosphère de 5% en CO₂.

TABLEAU 2.3
Suppléments ajoutés au milieu de culture des lignées cancéreuses
HeLa, H79, Jurkat, SP6.5, SP8.0 et TP31

Constituants	Concentration de la solution mère	Concentration finale
FBS	100% (v/v)	10% (v/v)
Glutamine	200 mM	2 mM
NaHCO ₃	poudre	14,3 mM
Gentamicine	10 mg/ml	15 µg/ml

Comme dans le cas des MCN, des passages sont effectués pour obtenir plus de cellules. Cependant, contrairement aux MCN qui n'ont pas à être passés pour demeurer

viables, les lignées cancéreuses doivent être souvent redivisées dans plusieurs pétris lorsqu'elles atteignent la confluence pour éviter leur décollement massif du pétri.

TABLEAU 2.4
Suppléments ajoutés au milieu de culture de la lignée cancéreuse HepG2

Constituants	Concentration de la solution mère	Concentration finale
FBS	100% (v/v)	10% (v/v)
Glutamine	200 mM	2 mM
NaHCO ₃	poudre	44 mM
P/S ¹	10 000 U/ml	50 U/ml

¹Pénicilline/Streptomycine

Des photos des MCN et des lignées cancéreuses TP31 et H79 ont été prises en contraste de phase à l'aide d'un microscope inversé (*Diaphot 300; Nikon*) muni d'un objectif 20X, afin de comparer leur morphologie. Les images ont été prises à l'aide d'un appareil photo numérique (*CoolPix 4500; Nikon*).

2.2 CYTOMÉTRIE DE FLUX

Voici brièvement une description de la technique de cytométrie de flux. Des cellules en suspension sont d'abord mises en présence d'un anticorps primaire qui liera spécifiquement la protéine d'intérêt. Un anticorps secondaire marqué avec un fluorophore sera ensuite ajouté. Il liera spécifiquement l'anticorps primaire et permettra ainsi de détecter la protéine ciblée par le biais du fluorophore. Au sein du cytomètre de flux, les cellules défilent une à une à très grande vitesse dans la chambre d'analyse et passent ensuite devant un système optique comprenant une source lumineuse constituée d'un ou de plusieurs lasers et un système d'analyse de la lumière blanche et de la fluorescence émise par les fluorophores des anticorps liés aux cellules. Le système optique possède d'abord deux détecteurs de la lumière blanche : (1) un détecteur de la lumière diffusée ou déviée (90°) qui permet de mesurer l'abondance du cytoplasme et sa densité optique, ainsi que la taille de la cellule et (2) un détecteur de la lumière transmise

(0°) qui permet le dénombrement des cellules. Ces deux détecteurs vont permettre d'analyser un nombre déterminé de cellules (10 000 cellules par échantillon) et également de sélectionner la région où l'on retrouve les cellules vivantes et isolées. Ensuite, les fluorophores qui sont excités par le faisceau laser émettent de la fluorescence et des filtres permettent de sélectionner précisément la longueur d'onde d'émission correspondant au(x) fluorophore(s) utilisé(s). L'intensité lumineuse émise étant très faible, les signaux sont alors amplifiés par des tubes photomultiplicateurs (TPM), puis traités numériquement pour les représenter sous forme graphique.

2.2.1 Marquage des cellules pour la cytométrie de flux

Les manipulations pour le marquage des cellules sont réalisées sur glace. La centrifugeuse *Biofuge pico* et le rotor 3325 (*Heraeus*) ont été utilisés pour toutes les étapes de centrifugation. Les cellules sont d'abord détachées du pétri avec du *phosphate buffered saline/ethylenediaminetetraacetic acid* 2 mM (PBS 1X/EDTA) (PBS : 9,1 mM Na_2HPO_4 , 1,7 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 7.4) et les agrégats cellulaires sont brisés par pipettages successifs. Suite au décompte des cellules à l'aide d'un hémacytomètre, la suspension de cellules est divisée dans plusieurs microtubes stériles; 500 000 cellules sont utilisées pour chaque anticorps. Les microtubes sont ensuite centrifugés durant 3 min à 2 000 rpm et le surnageant est enlevé à l'aide d'une pipette. Les cellules sont par la suite rincées une fois avec 150 μl de milieu de culture, centrifugées pendant 3 min à 2 000 rpm pour enlever le surnageant, puis les cellules sont rincées une seconde fois avec 150 μl de tampon de lavage (0,1% BSA dans du PBS 1X), centrifugées durant 3 min à 2 000 rpm et le surnageant est jeté. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 50 μl de tampon de lavage et l'anticorps primaire (ou le sérum contrôle; contrôle négatif) est ajouté pour obtenir une dilution finale de 1/50 (voir tableau 2.5). Les microtubes sont incubés pendant 45 min sur glace, puis les cellules sont lavées deux fois par centrifugation avec 150 μl de tampon de lavage durant 3 min à 2 000 rpm. Les culots de cellules sont resuspendus dans 50 μl de tampon de lavage contenant l'anticorps secondaire à une dilution de 1/250. Les cellules sont ensuite

incubées sur glace durant 45 min à l'obscurité. Finalement, les cellules sont rincées trois fois avec 150 µl de tampon de lavage par centrifugation durant 3 min à 2 000 rpm, resuspendues dans 500 µl de tampon de lavage, puis transférées dans un tube de verre. Les échantillons sont conservés sur glace, à la noirceur, jusqu'à l'analyse effectuée par le technicien.

TABLEAU 2.5
Anticorps primaires et secondaires utilisés en cytométrie de flux

Anticorps	Espèces	Compagnies
Anti- α 1	souris	Chemicon
Anti- α 2	souris	Chemicon
Anti- α 3	souris	Chemicon
Anti- α 4	souris	Dr Sanchez Madrid ¹
Anti- α 5	souris	Chemicon
Anti- α 6	rat	Chemicon
Anti- α v	souris	Chemicon
Anti- β 1	souris	Dr Bosco Chan ²
Anti- β 3	souris	Chemicon
Anti- β 4	souris	Chemicon
Anti- β 5	lapin	Chemicon
Anti-souris Alexa Fluor 488	chèvre	Molecular Probes
Anti-rat FITC ³	lapin	Sigma
Anti-lapin Alexa Fluor 488	chèvre	Molecular Probes

¹Affiliation : *Servicio de Inmunología, Universidad Autónoma de Madrid, España.*

²Affiliation : *Transplantation and Immunology Group, John P. Roberts Research Institute, University of Western Ontario.*

³Fluorescéine isothiocyanate

2.2.2 Interprétation des résultats de cytométrie de flux

Les résultats de cytométrie de flux sont visualisés sous forme de courbe représentant le nombre de cellules en fonction du logarithme de la fluorescence (voir figure 2.1). Les résultats obtenus pour les profils d'expression des intégrines ont été interprétés selon les courbes typiques montrées à la figure 2.1 : (A) lorsqu'aucun déplacement n'est remarqué par rapport à la courbe contrôle (courbe en pointillée), le résultat est négatif (-); (B) lorsqu'on observe un déplacement léger par rapport au contrôle, le résultat est positif (+); (C) en présence d'un déplacement moyen

comparativement à la courbe contrôle, le résultat est très positif (++) ; et enfin, (D) un déplacement important par rapport au contrôle est interprété comme un résultat fortement positif (+++).

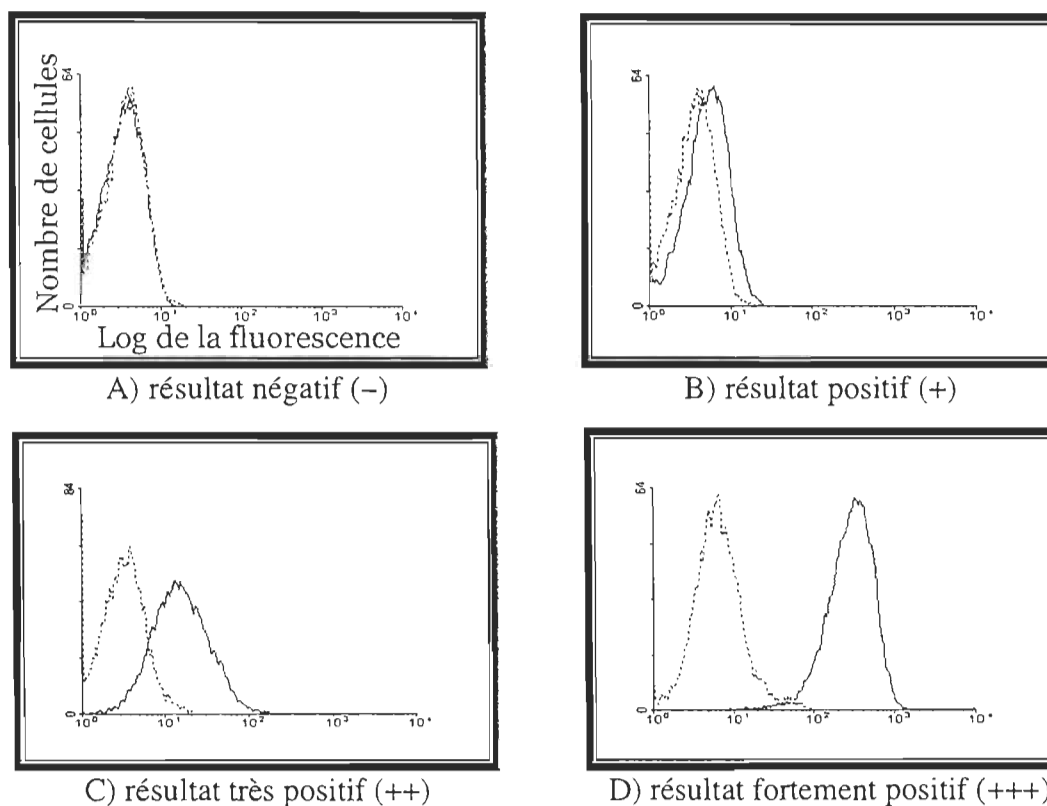


FIGURE 2.1 : Résultats typiques de cytométrie de flux.

2.3 CONSTRUCTION D'UNE BANQUE DE SOUSTRACTION « TUMEUR PRIMAIRE (LIGNÉE TP31) – MCN »

Cette technique permet de comparer les populations d'ARNm de la lignée cancéreuse TP31 avec celles des MCN et d'amplifier les gènes qui sont spécifiquement exprimés par la lignée cancéreuse TP31 provenant d'une tumeur primaire du mélanome uvéal.

2.3.1 Préparation de l'ARN et de l'ADNc des MCN et de la lignée cancéreuse TP31

La préparation de l'ARN et de l'ADNc des MCN et de la lignée cancéreuse TP31 est nécessaire pour débiter la banque de soustraction.

2.3.1.1 Extraction de l'ARNm des MCN et de la lignée cancéreuse TP31

Les protocoles utilisés sont ceux des trousse *RNeasy Mini* et *Oligotex mRNA* de la compagnie *QIAGEN*. Les donneurs utilisés pour l'extraction de l'ARN des MCN sont indiqués dans le tableau 2.6.

TABLEAU 2.6

Donneurs utilisés pour l'extraction de l'ARN des MCN

Donneurs	Âge	Donneurs	Âge
MS13P2 ¹	20 ans	MS45P2	16 ans
MS15P2	55 ans	MS46P2	7 jours
MS17P2	21 ans	MS47P2	23 ans
MS37P2	10 mois	MS52P2	9 ans
MS38P2	19 ans	MS54P2	62 ans
MS40P2	18 ans	MS56P2	58 ans
MS41P2	24 semaines foetales	MS59P2	53 ans
MS43P2	38 ans	MS60P2	2,5 ans
MS44P2	44 ans	MS61P2	4 mois

¹P2 : deuxième passage

La trousse *RNeasy Mini* est utilisée en premier lieu pour extraire l'ARN total des cellules. Ce système spécialisé de tampons riches en sels permet à plus de 100 µg d'ARN d'une longueur supérieure à 200 nucléotides de se lier à la membrane de gel de silice *RNeasy*. Les échantillons biologiques sont d'abord lysés et homogénéisés en présence d'un tampon très dénaturant contenant de la *guanidine isothiocyanate* (GITC), laquelle inactive immédiatement les ARNases pour assurer une isolation d'ARN intact. De l'éthanol est ensuite ajouté pour créer les conditions de liaison appropriées et l'échantillon est déposé sur une colonne *RNeasy*. L'ARN total se lie à la membrane et les contaminants sont efficacement éliminés par lavage. Avec cette trousse d'extraction

de l'ARN, toutes les molécules d'ARN de plus de 200 nucléotides sont isolées. Les autres types d'ARN (ARNr 5S et 5.8S, ARNt) sont sélectivement exclus, car leur longueur est inférieure à 200 nucléotides.

L'ARN total obtenu est ensuite dosé par spectrophotométrie (biophotomètre *Eppendorf*) pour déterminer la concentration par la mesure de l'absorbance à 260 nm (pic d'absorption de l'ARN). Une absorbance de 1.0 à 260 nm pour l'ARN correspond ainsi à une concentration de 40 µg/ml en utilisant une valeur de $0,025 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour le coefficient d'extinction molaire. Puisque les protéines absorbent à 280 nm, mais également à 260 nm, une mesure supplémentaire de la densité optique à 280 nm est effectuée pour obtenir le rapport 260/280. L'ARN pur doit avoir un rapport 260/280 compris entre 1,8 et 2. Finalement, on fait migrer un échantillon d'ARN de chaque type cellulaire sur un gel d'agarose 1,5% TBE 1X (Tris/Borate/EDTA: 89 mM Tris base, 89 mM acide borique, 20 mM EDTA, pH 8.0) coloré au bromure d'éthidium (0,01 mg/100 ml), pendant 20 min à 100 V, pour vérifier l'intégrité de l'ARN. La présence des deux bandes d'ARNr (18S et 28S) et la comparaison de leur intensité permet de confirmer l'intégrité de l'ARN obtenu. Ainsi, la bande de 28S doit être approximativement deux fois plus intense que celle de 18S.

Par la suite, la trousse *Oligotex mRNA* est utilisée pour isoler l'ARNm à partir de l'ARN total. La suspension *Oligotex* est constituée de petites particules de polystyrène-latex de dimension uniforme (1,1 µm de diamètre) et de forme parfaitement sphérique. Des oligonucléotides dC10 T30 (10 déoxycytidines et 30 déoxythymidines) sont liés de façon covalente à la surface des particules via une réaction de condensation. Les particules forment une suspension stable qui procure une grande surface pour une liaison rapide et efficace des acides polyadényliques. La procédure tire avantage du fait que la majorité des ARNm eucaryotes (1-5% des ARN cellulaires) se terminent par une queue de poly-A de 20 à 250 adénosines. À l'opposé, l'ARNr et l'ARNt, qui représentent plus de 95% des ARN cellulaires, ne sont pas polyadénylés. L'ARNm poly-A+ peut être purifié via l'hybridation de la queue de poly-A+ à un oligomère dT couplé à une matrice en phase solide. Les ARNr et ARNt qui n'ont pas de queue de poly-A+, ne se lient pas à

l'oligo-dT et sont donc facilement éliminés lors des lavages. L'hybridation requérant une forte concentration de sels, l'ARNm poly-A⁺ peut être facilement élué en diminuant la force ionique pour déstabiliser les hybrides dT:A.

2.3.1.2 Transcription de l'ARNm des MCN et de la lignée cancéreuse TP31 en ADNc : principe de la trousse *Smart PCR cDNA Synthesis*

Le protocole utilisé est celui de la trousse *Smart PCR cDNA Synthesis* de la compagnie *Clontech*. Les différentes étapes de la trousse *Smart PCR cDNA Synthesis* sont représentées dans la figure 2.2. Toutes les méthodes habituellement utilisées pour synthétiser l'ADNc reposent sur la capacité de la transcriptase inverse à transcrire l'ARNm en ADN simple brin lors de la réaction de synthèse du premier brin. Cependant, puisque la plupart des transcriptases inverses ne peuvent pas toujours transcrire la séquence de l'ARNm en entier, l'extrémité 5' des gènes tend à être sous-représentée dans les populations d'ADNc. Cependant, la méthode de la trousse *Smart PCR cDNA Synthesis* permet d'enrichir préférentiellement les ADNc pleine longueur grâce à son amorce oligo-dT modifiée et à ses oligonucléotides particuliers. Une amorce oligo-dT modifiée (3' *SMART CDS Primer II A*) débute la réaction de synthèse du premier brin. Lorsque la transcriptase inverse atteint l'extrémité 5' de l'ARNm, l'activité de transférase terminale de l'enzyme ajoute quelques nucléotides, surtout des déoxycytidines, à l'extrémité 3' de l'ADNc. Les oligonucléotides du *SMART* qui ont une séquence oligo-G à leur extrémité 3', s'apparient avec l'allongement de déoxycytidines, créant une extension du brin. La transcriptase inverse change alors de brin et continue la synthèse du premier brin jusqu'à la fin de l'oligonucléotide. L'ADNc simple brin complet qui en résulte contient l'extrémité 5' complète de l'ARNm, tout comme les séquences qui sont complémentaires aux oligonucléotides du *SMART*. La séquence d'ancrage du *SMART* et la séquence poly-A servent de sites universels pour débiter l'amplification de l'ADNc d'une extrémité à l'autre. Ainsi, les ADNc sans extrémité 5' (ADNc prématurément terminés par une activité incomplète de la transcriptase inverse),

l'ADN génomique contaminant ou encore les ADNc transcrits à partir d'ARN sans queue poly-A+, ne seront pas amplifiés de façon exponentielle lors du PCR subséquent.

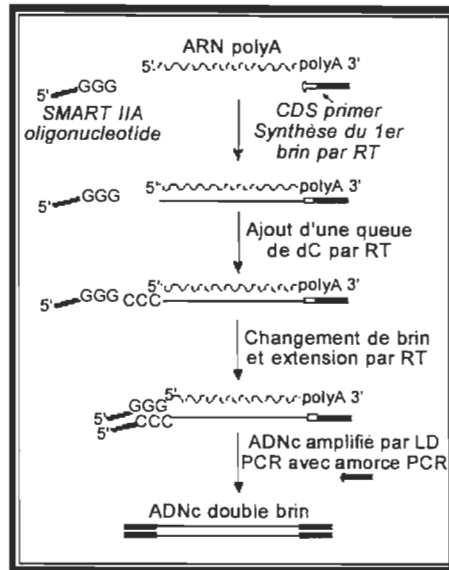


FIGURE 2.2 : Étapes de la trousse *Smart PCR cDNA Synthesis*. Image tirée du site Internet <http://www.clontech.com>.

2.3.1.2.1 Synthèse du premier brin d'ADNc

La centrifugeuse *Biofuge pico* et le rotor 3325 (*Heraeus*) ont été utilisés pour toutes les étapes de centrifugation. Trois échantillons du *tester* (lignée TP31) et trois échantillons du *driver* (MCN) sont préparés. Le terme *tester* est utilisé en référence à l'ADNc qui contient les transcrits spécifiques (différentiellement exprimés) à la lignée cancéreuse TP31 et le terme *driver* est utilisé pour l'ADNc de référence qu'on utilise pour soustraire les ADNc communs aux deux types de cellules. D'abord les réactifs suivants sont mélangés, puis centrifugés brièvement : 3 µl d'ARNm (0,5 µg/µl), 1 µl de 3' *Smart CDS primer II A* (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₍₃₀₎N₁-N-3'; N= A, C, G ou T; N₁= A, G ou C) et 1 µl de *Smart II A oligonucleotide* (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'). Le microtube est incubé à 70°C dans le PCR durant 2 min, centrifugé à 9000 rpm durant 5 sec et les réactifs suivants sont ajoutés : 2 µl de tampon *5X First-Strand* (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 30 mM MgCl₂),

1 µl de dithiothréitol (DTT, 20 mM), 1 µl de 50X dNTP et 1 µl de transcriptase inverse *Powerscript* (concentration non indiquée par la compagnie *Clontech*). Le microtube est vortexé, centrifugé à 9000 rpm pendant 5 sec, puis incubé à 42°C durant une heure dans le PCR. Le produit de la réaction est dilué dans 450 µl de tampon TE (Tris/EDTA : 10 mM Tris pH 7.6, 1 mM EDTA), puis chauffé à 72°C durant 7 min. Un PCR avec des amorces pour l'actine est effectué pour vérifier si la transcription inverse a eu lieu (voir tableau 2.7 pour le mélange mère). Les cycles utilisés pour la réaction sont les suivants : (1) dénaturation initiale pendant 3 min à 95°C, (2) dénaturation pendant 30 sec à 94°C, (3) hybridation des amorces pendant 2 min à 55°C, (4) extension pendant 2,15 min à 72°C et (5) extension finale pendant 7 min à 72°C. Les étapes 2-3-4 sont répétées sur 35 cycles avant d'en arriver à l'étape d'extension finale.

TABLEAU 2.7

Concentration des réactifs utilisés pour le mélange mère des réactions PCR

Réactifs	Concentrations finales
Eau déionisée et stérile	-
Tampon (NH ₄) ₂ SO ₄ (10X)	1X
Mélange de dNTP (10 mM)	250 µM
Amorce actine 5' (10 µM) ¹	0,5 µM
Amorce actine 3' (10 µM) ²	0,5 µM
<i>Taq ADN polymérase</i>	1 U/20 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 mM
ADNc	1 µl/20 µl

¹5'-TGTCCACCTTCCAGCAGATGT-3'

²5'-CACTCCCAGGGAGACCAAAA-3'

On fait ensuite migrer 10 µl du produit PCR sur un gel d'agarose 1,2% TBE 1X coloré au bromure d'éthidium à 100 V durant 45 min. Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à la prochaine étape.

2.3.1.2.2 Amplification de l'ADNc par *long-distance polymerase chain reaction* (LD PCR)

Cette étape permet la synthèse du deuxième brin, ainsi que l'amplification de

l'ADNc. La centrifugeuse *Biofuge pico* et le rotor 3325 (*Heraeus*) ont été utilisés pour toutes les étapes de centrifugation. Deux échantillons d'ADNc du *tester* (lignée TP31) et deux échantillons d'ADNc du *driver* (MCN) sont préparés, ainsi que deux échantillons additionnels, un du *tester* et un autre du *driver* (ces échantillons additionnels seront utilisés plus tard pour la détermination du nombre de cycles PCR requis). Le PCR est préchauffé à 95°C et les réactifs suivants sont mélangés pour chaque réaction : 74 µl d'eau déionisée, 10 µl de tampon *10X Advantage 2 PCR* (400 mM Tricine-KOH pH 8.7, 150 mM KOAc, 35 mM Mg(OAc)₂, 37,5 µg/ml BSA, 0,05% *Tween 20*, 0,05% Nonidet-P40), 2 µl de *50X dNTP mix* (10 mM de dATP, dCTP, dGTP et dTTP), 2 µl de *5' PCR Primer II A* (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') et 2 µl d'un mélange de polymérases *50X Advantage 2* (BD *Taq* ADN polymérase *Titanium*, polymérase correctrice, *Taq Start Antibody* (1,1 µg/µl), solubilisés dans un tampon 15 mM Tris-HCl pH 8.0, 75 mM KCl, 0,05 mM EDTA, 50% glycérol). Le microtube est vortexé, centrifugé à 9000 rpm durant 5 sec et ce mélange est ajouté à 2 µl d'ADNc simple brin synthétisé à la section précédente (voir section 2.3.1.2.1). Le tout est mélangé doucement, centrifugé brièvement à 9000 rpm durant 5 sec et les cycles utilisés pour la réaction PCR sont les suivants : 95°C durant 1 min, puis 15 cycles des 3 étapes suivantes, 95°C durant 5 sec, 65°C durant 5 sec, 68°C durant 6 min. Après ces 15 cycles, 15 µl de chaque échantillon additionnel (*tester* et *driver*) sont transférés dans un microtube de 1,5 ml pour l'analyse sur gel, puis 3 cycles PCR supplémentaires sont faits avec le reste du produit PCR (18 cycles au total). Quinze µl sont transférés de nouveau pour l'analyse sur gel et 3 cycles supplémentaires sont faits (21 cycles au total). Quinze µl sont encore transférés et 3 derniers cycles supplémentaires sont effectués (24 cycles au total). On fait ensuite migrer 5 µl des échantillons additionnels prélevés aux cycles 15, 18, 21 et 24 sur un mini-gel d'agarose 1,2% TBE 1X coloré au bromure d'éthidium à 80 V durant 20 min. Dans la figure 7 de la page 28 du protocole PT3041-1 de *Clontech*, on peut voir que le produit PCR atteint un plateau après 18 cycles; c'est le niveau où la quantité de produits PCR cesse d'augmenter. Puisque le plateau est atteint après 18 cycles, le nombre optimum de cycles PCR pour les mesures subséquentes a été fixé à 17. En choisissant le nombre optimum de cycles PCR, on s'assure que l'amplification de l'ADNc double brin demeure dans sa phase exponentielle. D'ailleurs, l'ADNc amplifié par un trop grand

nombre de cycles est un très mauvais matériel pour la banque de soustraction (génération de bandes parasites et de traînées composées de produits de haut poids moléculaire riches en ADN simple brin (Bell et DeMarini, 1991)), alors qu'un nombre insuffisant de cycles diminue la quantité de produit PCR obtenue à la fin. Le nombre optimum de cycles doit donc être plus faible que le nombre de cycles nécessaire pour atteindre le plateau. Il faut faire preuve d'un jugement conservateur. Dans le doute, il vaut mieux utiliser moins que trop de cycles. Après avoir déterminé le nombre optimum de cycles, les cycles additionnels nécessaires sont effectués pour les autres microtubes de *tester* et de *driver*. Pour arrêter la réaction, 2 µl de 0,5 M EDTA sont ajoutés à chaque tube et 7 µl sont transférés dans un microtube de 0,5 ml et conservés à -20°C (échantillon A). Enfin, on fait migrer 5 µl des microtubes de *tester* et de *driver* sur un mini-gel d'agarose 1,2% TBE 1X coloré au bromure d'éthidium à 80 V durant 20 min et un PCR est également effectué avec les amorces pour l'actine pour vérifier l'intégrité de l'ADNc (même nombre de cycles et mélange mère qu'à la section 2.3.1.2.1).

2.3.1.2.3 Chromatographie sur colonne

Une chromatographie sur colonne est ensuite effectuée pour purifier l'ADNc. Les deux échantillons *tester* sont combinés, ainsi que les deux échantillons *driver*. Ensuite, un volume égal de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, v/v/v) est ajouté à chaque tube, vortexé vigoureusement, puis centrifugé à 14 000 rpm durant 10 min. Seule la phase aqueuse (phase supérieure) est conservée, à laquelle est ajoutée 700 µl de n-butanol. Le microtube est vortexé vigoureusement, centrifugé à 14 000 rpm durant 1 min. La phase organique (phase supérieure) est ensuite jetée. Si le volume de la phase aqueuse ne se situe pas entre 40 et 70 µl (volume idéal pour la colonne *Chroma Spin 100*), il faut recommencer l'extraction au n-butanol. Si le volume est plus petit que 40 µl, il faut ajouter de l'eau déionisée pour atteindre un volume entre 40 et 70 µl. Ensuite, une colonne *Chroma Spin 100* est utilisée selon le protocole de la compagnie *Clontech* pour purifier l'ADNc. On fait ensuite migrer 3 µl de l'échantillon A (recueilli à la

section 2.3.1.2.2), 10 µl de l'échantillon B (purifié, première fraction) et 10 µl de l'échantillon C (purifié, deuxième fraction) sur un mini-gel d'agarose 1,2% TBE 1X coloré au bromure d'éthidium à 80 V durant 20 min. L'intensité des traînées des échantillons A (non purifié) et B est comparée et le pourcentage de récupération du produit PCR après la chromatographie est estimé; typiquement, on obtient un rendement de 50%. Si le pourcentage est inférieur à 30%, il faut vérifier si l'ADNc est présent dans l'échantillon C. Si cette fraction a un meilleur rendement que la première, il faut combiner les deux, puis procéder à la digestion de cet ADNc avec l'enzyme de restriction *RsaI*.

2.3.1.2.4 Digestion de l'ADNc avec l'enzyme de restriction *RsaI*

RsaI est une enzyme de restriction (sites : 5'-GT | AC-3' et 3'-CA | TG-5') qui digère l'ADNc de façon à produire de courts fragments aux extrémités franches. La production de courts fragments va favoriser la réussite de la soustraction, alors que les extrémités franches vont permettre la liaison des adaptateurs de la banque de soustraction qui ont un demi-site de digestion par la *RsaI* à leur extrémité 3' (voir tableau 2.8 pour la séquence des adaptateurs). La centrifugeuse *Biofuge pico* et le rotor 3325 (*Heraeus*) ont été utilisés pour toutes les étapes de centrifugation. Avant de débiter la digestion, 10 µl d'ADNc sont réservés (échantillon D) pour une analyse sur mini-gel d'agarose. Ensuite, il faut ajouter au reste de l'ADNc (échantillon E), 34,5 µl de tampon de restriction 10X *RsaI* (100 mM Bis Tris propane-HCl pH 7.0, 100 mM MgCl₂, 1 mM DTT) et 1,5 µl de *RsaI* (10 U/µl). Le tout est mélangé en vortexant, centrifugé à 9000 rpm durant 5 sec et incubé à 37°C durant 3 heures dans un bain-marie. Pour arrêter la réaction, 8 µl de 0,5 M EDTA sont ajoutés et 10 µl de cet échantillon E sont conservés à -20°C. Pour vérifier la digestion, on fait migrer 10 µl de l'échantillon D et 10 µl du produit de digestion de l'échantillon E sur mini-gel d'agarose 1,2% TBE 1X coloré au bromure d'éthidium à 80 V durant 20 min. Un résultat typique de la digestion est montré à la figure 4 de la page 28 du protocole PT1117-1 de *Clontech*. Ainsi, avant la digestion,

l'ADNc apparaît sous forme d'une traînée qui s'étend de 0,5 à 10 kb (puits #1), tandis qu'après la digestion, la traînée s'étend plutôt de 0,1 à 2 kb (puits #2).

2.3.1.2.5 Purification de l'ADNc digéré

Le produit de la digestion obtenu à la suite du traitement avec la *RsaI* est séparé en deux tubes (170 µl/tube) et purifié à l'aide de la trousse *NucleoTrap PCR Purification* de la compagnie *Clontech*. Le principe de cette trousse repose sur l'emploi d'une matrice activée spéciale (suspension composée de billes de silice de dimension uniforme et de forme sphérique) qui lie les acides nucléiques d'une longueur supérieure à 120 pb et les sépare des autres contaminants (amorces, dimères d'amorces). Dix µl de l'échantillon E (avant purification) et 10 µl de l'échantillon F (après purification) sont migrés sur un mini-gel d'agarose 1,5% TBE 1X coloré au bromure d'éthidium, à 80 V durant 15 min et le pourcentage de récupération de l'ADNc est estimé en comparant l'intensité des échantillons entre eux. Le rendement devrait être d'environ 70%. La quantité d'ADNc contenue dans 10 µl d'échantillon G (échantillon précipité) est également estimée en comparant son intensité sur gel d'agarose 1,2% TBE 1X coloré au bromure d'éthidium, à celles de différentes quantités (0,3 µg, 0,6 µg et 1 µg) du plasmide pSEAP2 dont les concentrations sont connues. La quantité d'ADNc devrait se situer entre 1 à 3 µg par réaction.

2.3.2 Principe de la banque de soustraction « (lignée TP31) – MCN »

La trousse *PCR-Select cDNA Subtraction* et le protocole utilisé proviennent de la compagnie *Clontech*. Une cellule de mammifère typique contient de 10 à 30 pg d'ARN total. La majorité des molécules d'ARN, sont des ARNt et des ARNr, l'ARNm représentant seulement 1-5% de tous les ARN cellulaires. Approximativement 360 000 molécules d'ARNm sont présentes par cellule de mammifère. La banque de soustraction

est une technique puissante qui permet de comparer deux populations d'ARNm et d'obtenir des clones de gènes qui sont exprimés spécifiquement dans un seul type de cellule (Diatchenko et al., 1999). Premièrement, les deux populations d'ARNm ont été converties en ADNc à l'aide de la trousse *Smart PCR cDNA Synthesis* (voir figure 2.3, étape A). L'ADNc a ensuite été digéré avec l'enzyme de restriction *RsaI* à l'aide de la trousse *Smart PCR cDNA Synthesis* pour permettre la liaison d'adaptateurs (voir figure 2.3, étape B). Puis, les prochaines étapes sont effectuées avec la trousse *PCR-Select cDNA Subtraction*. Le *tester* est d'abord divisé en deux portions et chacune est liée avec un adaptateur différent (voir figure 2.3, étape C). Les extrémités des adaptateurs n'ont pas de groupement phosphate, alors seulement un brin de chaque adaptateur peut s'attacher aux extrémités 5' des ADNc. Les deux adaptateurs ont des longueurs qui sont identiques permettant ainsi l'appariement des amorces PCR une fois que les extrémités manquantes sont complétées par l'ADN polymérase. Deux hybridations sont alors réalisées. Dans la première (voir figure 2.4, étape A), un excès de *driver* est ajouté à chaque échantillon de *tester*. Chaque échantillon de *tester* (possédant l'adaptateur 1 ou 2 à leur extrémité 5') mélangé à un excès de *driver* est ensuite dénaturé par chauffage et les transcrits présents dans les deux types de cellules peuvent donc s'apparier entre eux, générant ainsi des molécules de types A (transcrits rares spécifiques au *tester*), B (transcrits abondants spécifiques au *tester*), C (transcrits présents chez le *tester* et le *driver*) et D (transcrits rares et abondants qui sont spécifiques au *driver*) dans chaque échantillon (voir figure 2.4, étape A). Durant la seconde hybridation (voir figure 2.4, étape B), les deux échantillons de *tester* de la première hybridation sont mélangés ensemble, puis les transcrits sont hybridés sans dénaturation. Seuls les transcrits qui ne se sont pas appariés durant la première hybridation peuvent donc s'associer et former de nouveaux hybrides de type E (transcrits spécifiques au *tester*; voir figure 2.4, étape B). Ces nouveaux hybrides sont des transcrits double brin spécifiques au *tester* avec les deux différents adaptateurs à leurs extrémités. De l'ADNc de *driver* fraîchement dénaturé est alors ajouté pour enrichir la fraction de molécules de type E en éliminant l'ADNc restant commun au *tester* et au *driver*.

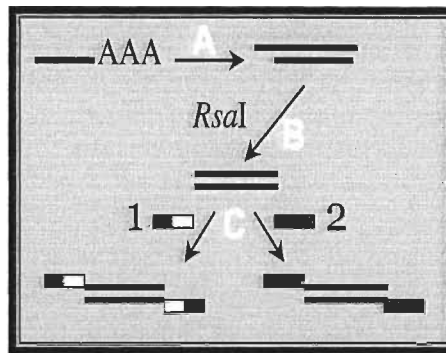


FIGURE 2.3 : Liaison des adaptateurs au *tester*. (A) transcription inverse, (B) digestion, (C) liaison des adaptateurs.

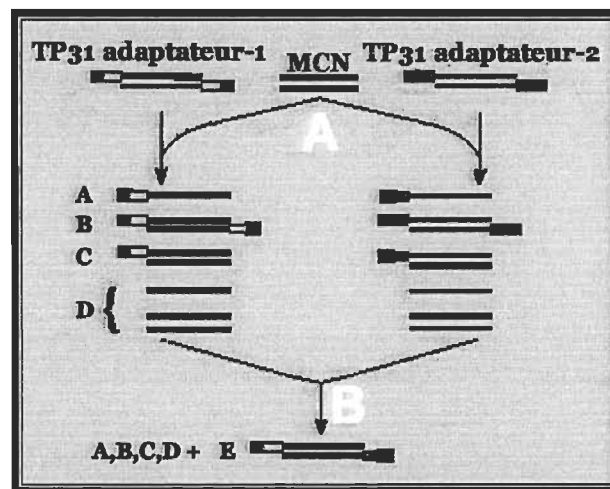


FIGURE 2.4 : Hybridations des transcrits des deux types de cellules. Modification d'une image tirée du site Internet <http://www.clontech.com>. (A) première hybridation, (B) deuxième hybridation.

Ensuite, les extrémités manquantes des adaptateurs sont complétées à l'aide de l'ADN polymérase, créant ainsi les sites d'appariement pour les amorces imbriquées (*Nested PCR Primers*) (voir figure 2.5). La population entière des transcrits hybridés et non hybridés est alors sujette à une première amplification PCR, afin d'amplifier les transcrits double brin qui possèdent des adaptateurs. Les adaptateurs sont un site d'appariement pour les amorces PCR. Durant cette amplification PCR, les molécules de types A et D (voir figure 2.5, étape A), qui sont simple brin ou qui n'ont pas les sites d'appariement pour les amorces PCR, ne peuvent pas être amplifiées.

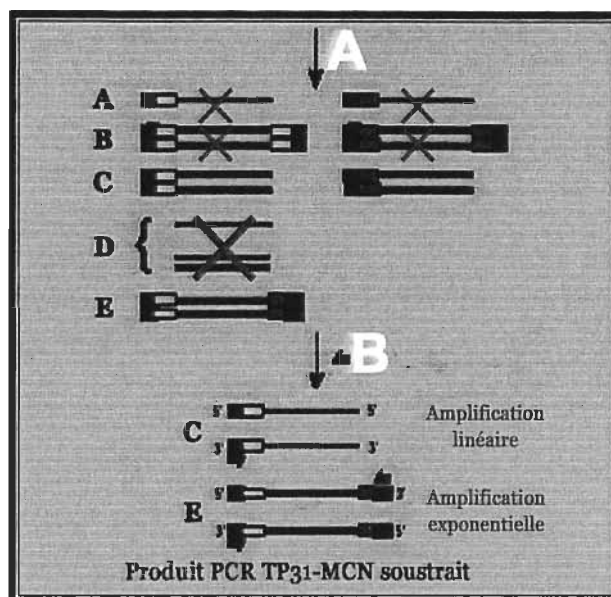


FIGURE 2.5 : Amplifications PCR des molécules de types C et E (suite de la figure 2.4). Modification d'une image tirée du site Internet <http://www.clontech.com>. (A) première amplification PCR, (B) deuxième amplification PCR.

À cause de l'effet de suppression PCR, la plupart des molécules de type B forment une structure en forme de poêle qui prévient leur amplification exponentielle (voir figure 2.6). L'effet suppresseur PCR se produit lorsque des transcrits possèdent le même adaptateur à leurs extrémités. Étant donné que les séquences des adaptateurs sont complémentaires, les extrémités s'apparient et forment une structure en forme de poêle qui empêche alors l'amplification exponentielle de ce type de molécule. Si, lors du PCR, une amorce parvient malgré tout à lier un ADNc simple brin et qu'il y a synthèse du brin complémentaire, l'étape de dénaturation suivante va créer deux ADNc simple brin qui formeront à leur tour des structures en forme de poêle. Ensuite, les molécules de type C (figure 2.5, étape B) qui ont seulement un site d'appariement pour les amorces peuvent seulement être amplifiées linéairement. Seules les molécules de type E, qui ont deux adaptateurs différents à leurs extrémités, peuvent être amplifiées de façon exponentielle, car elles possèdent un site d'appariement aux extrémités 3' et 5' (transcrits exprimés différemment par la lignée TP31) (voir figure 2.5, étape B). Enfin, une seconde amplification PCR est réalisée afin de réduire le bruit de fond et enrichir les transcrits spécifiques au *tester*.

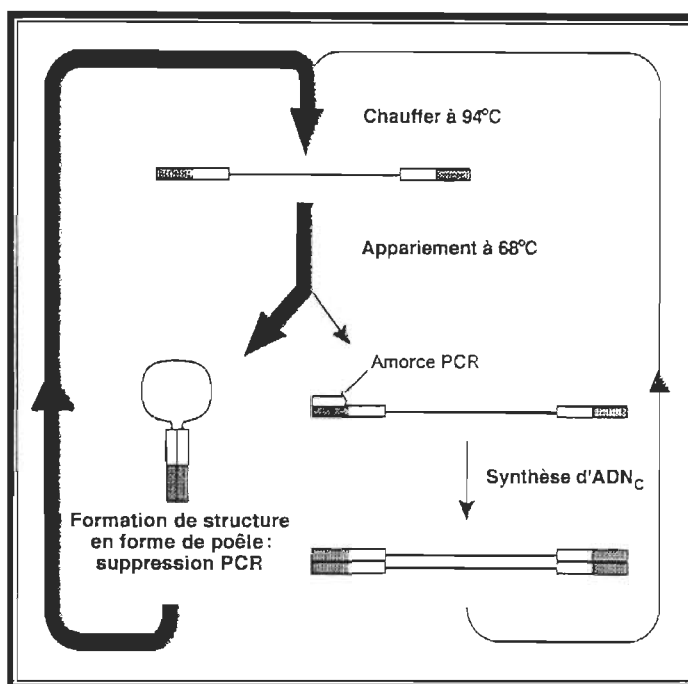


FIGURE 2.6 : Effet suppresseur PCR empêchant l'amplification des molécules de type B. Image tirée du site Internet <http://www.clontech.com>.

En résumé, la banque de soustraction permet trois choses : (1) de réduire l'amplification des transcrits communs aux deux types de cellules afin de les éliminer, (2) de normaliser les transcrits rares versus les transcrits abondants et (3) d'isoler les transcrits spécifiquement exprimés par la lignée cancéreuse TP31. Les détails des différentes étapes de la banque de soustraction, soit la ligation des adaptateurs (section 2.3.2.1), la première et la deuxième hybridation (sections 2.3.2.2 et 2.3.2.3), ainsi que les deux amplifications PCR (sections 2.3.2.4 et 2.3.2.5), sont décrites dans les prochaines sections.

2.3.2.1 Ligation des adaptateurs de la banque de soustraction

Deux soustractions sont effectuées (« lignée TP31 – MCN » (soustraction directe) et « MCN – lignée TP31 » (soustraction inverse)) pour faire un criblage différentiel à la fin de la soustraction et ainsi éliminer les faux positifs. La centrifugeuse *Biofuge pico* et le rotor 3325 (*Heraeus*) ont été utilisés pour toutes les étapes de centrifugation. D'abord,

le mélange mère suivant est préparé : pour chaque réaction, 3 µl d'eau déionisée et stérile, 2 µl de tampon de ligation 5X (250 mM Tris-HCl pH 7.8, 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,25 mg/ml BSA) et 1 µl de T4 ADN ligase (400 U/µl) sont mélangés dans un tube. Pour chaque *tester* ((lignée TP31 dans la soustraction directe (*testers* 1-1, 1-2) et MCN dans la soustraction inverse (*testers* 2-1, 2-2)), les réactifs utilisés pour la ligation des adaptateurs (voir tableau 2.8) sont combinés dans un tube de 0,5 ml et mélangés vigoureusement. Dans un tube de 0,5 ml, 2 µl du *tester* 1-1 et 2 µl du *tester* 1-2 sont mélangés. Lorsque la ligation sera complétée, il s'agira du *Unsubtracted tester control 1*. On procède de la même façon avec 2 µl du *tester* 2-1 et 2 µl du *tester* 2-2; il s'agira du *Unsubtracted tester control 2*.

TABLEAU 2.8
Réactifs utilisés pour la ligation des adaptateurs

Réactifs	<i>Tester</i> 1-1	<i>Tester</i> 1-2	<i>Tester</i> 2-1	<i>Tester</i> 2-1
<i>tester</i> lignée TP31 (300 ng/µl)	2 µl	2 µl	----	----
<i>tester</i> MCN (300 ng/µl)	----	----	2 µl	2 µl
Adaptateur 1 ¹ (10 µM)	2 µl	----	2 µl	----
Adaptateur 2 ² (10 µM)	----	2 µl	----	2 µl
Mélange mère	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl

¹5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCGAGGT-3'
3'-GGCCCGTCCA-5'

²5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'
3'-GCCGGCTCCA-5'

Les tubes sont alors centrifugés à 9000 rpm durant 5 sec et incubés à 16°C pendant toute la nuit dans le PCR, ce qui permet la ligation des adaptateurs à l'extrémité 5' des transcrits. Le lendemain, 1 µl d'un mélange EDTA/glycogène 20X (0,2 M EDTA, 1 mg/ml glycogène) est ajouté pour arrêter la réaction de ligation. Les échantillons sont ensuite chauffés à 72°C durant 5 min pour inactiver la ligase. Un µl de chaque *Unsubtracted tester control* est alors dilué dans 1 ml d'eau déionisée; ces échantillons seront utilisés plus tard en PCR aux sections 2.3.2.4 et 2.3.2.5 pour analyser l'efficacité des amplifications PCR. Tous les échantillons sont gardés à -20°C durant l'analyse de la ligation.

2.3.2.1.1 Analyse du résultat de la ligation des adaptateurs

La centrifugeuse *Biofuge pico* et le rotor 3325 (*Heraeus*) ont été utilisés pour toutes les étapes de centrifugation. Un μl de chaque *tester* (lié à un adaptateur), obtenu à l'étape précédente est dilué dans 50 μl d'eau déionisée. Les réactifs utilisés pour l'analyse de la ligation des adaptateurs (voir tableaux 2.9 et 2.10) sont alors combinés dans 4 tubes différents. Vingt-deux μl de mélange mère (voir tableau 2.10) sont ensuite ajoutés à chaque tube (tubes #1-4; tableau 2.9), bien mélangés et centrifugés à 9000 rpm durant 5 sec.

TABLEAU 2.9
Réactifs utilisés pour l'analyse de la ligation des adaptateurs

Réactifs	Tube #1	Tube #2	Tube #3	Tube #4
<i>Tester</i> 1-1 (lié à l'adaptateur 1)	1 μl	1 μl	---	---
<i>Tester</i> 1-2 (lié à l'adaptateur 2)	---	---	1 μl	1 μl
Amorce pour l'actine 3' ¹ (10 μM)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
Amorce pour l'actine 5' ² (10 μM)	---	1 μl	---	1 μl
<i>PCR primer</i> 1 ³ (10 μM)	1 μl	---	1 μl	---
Réactifs	Tube #5	Tube #6	Tube #7	Tube #8
<i>Tester</i> 2-1 (lié à l'adaptateur 1)	1 μl	1 μl	---	---
<i>Tester</i> 2-2 (lié à l'adaptateur 2)	---	---	1 μl	1 μl
Amorce pour l'actine 3' (10 μM)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
Amorce pour l'actine 5' (10 μM)	---	1 μl	---	1 μl
<i>PCR primer</i> 1 (10 μM)	1 μl	---	1 μl	---

¹Voir la séquence au bas du tableau 2.7

²Voir la séquence au bas du tableau 2.7

³5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

Les tubes sont incubés à 75°C durant 5 min dans un PCR pour allonger les adaptateurs, ce qui permet la création des sites d'appariement aux amorces PCR. Les cycles PCR suivants sont immédiatement commencés, sans que les échantillons ne soient retirés du PCR : 94°C durant 30 sec, puis 20 cycles des 3 étapes suivantes, 94°C durant 10 sec, 60°C durant 30 sec et 68°C durant 2,5 min. Cinq μl de chaque réaction PCR sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% TBE 1X coloré au bromure d'éthidium à 80 V durant 20 min. Le résultat est présenté à la figure 2.7.

TABLEAU 2.10
Réactifs utilisés pour le mélange mère

Réactifs	Pour une réaction
Eau déionisée et stérile	18,5 µl
Tampon de réaction PCR 10X	2,5 µl
Mélange de dNTP (10mM)	0,5 µl
Mélange d'ADNc polymérases <i>Advantage</i> 50X	0,5 µl

Le puits 1 contient le produit PCR amplifié à partir du *tester* 1-1 avec l'amorce pour l'actine 3' et le *PCR Primer 1* (750 pb). Le puits 2 représente le produit PCR amplifié à partir du *tester* 1-1 avec les amorces pour l'actine 3' et 5'. Le puits 3 contient le produit PCR amplifié à partir du *tester* 1-2 avec l'amorce pour l'actine 3' et celle du *PCR Primer 1* (750 pb). Enfin, le puits 4 renferme le produit PCR amplifié à partir du *tester* 1-2 avec les amorces pour l'actine 3' et 5'.

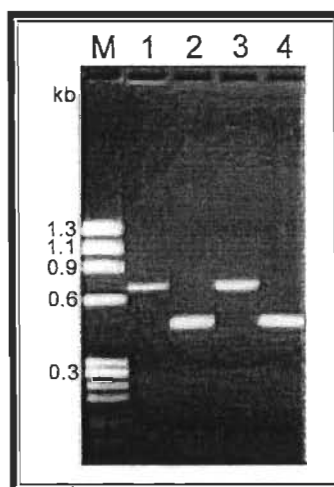


FIGURE 2.7 : Résultat typique de l'analyse de la ligation. Image tirée du site Internet <http://www.clontech.com>. (1) *tester* 1-1 avec l'amorce pour l'actine 3' et le *PCR Primer 1*, (2) *tester* 1-1 avec les amorces pour l'actine 3' et 5', (3) *tester* 1-2 avec l'amorce pour l'actine 3' et le *PCR Primer 1*, (4) *tester* 1-2 avec les amorces pour l'actine 3' et 5', (M) marqueur.

Ainsi, la bande du produit PCR amplifié avec une amorce spécifique à un gène (amorce pour l'actine 3', puits #1 et 3) et le *PCR Primer 1* doit avoir environ la même intensité que la bande du produit PCR amplifié avec les deux amorces spécifiques à un gène (amorces pour l'actine 3' et 5', puits #2 et 4). Sur cette figure, l'intensité des

bandes est approximativement la même, mais dans le cas où l'intensité des bandes diffère de plus de quatre fois, le rendement de la ligation est inférieur à 25% et la ligation doit donc être refaite.

2.3.2.2 Première hybridation de la banque de soustraction

Avant de débiter l'étape d'hybridation, il faut réchauffer le tampon d'hybridation 4X à la température ambiante durant 15-20 min et s'assurer qu'aucun culot ou précipité n'est visible. Si c'est nécessaire, le tampon est chauffé à 37°C durant 10 min pour dissoudre le précipité. Pour chaque soustraction (directe ou inverse), les réactifs utilisés pour la première hybridation sont combinés (voir tableau 2.11).

TABLEAU 2.11
Réactifs utilisés pour la première hybridation

Réactifs	Réactions d'hybridation			
	A	B	C	D
<i>Driver</i> digéré	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
<i>Tester</i> 1-1 lié à un adaptateur	1,5 µl	-----	-----	-----
<i>Tester</i> 1-2 lié à un adaptateur	-----	1,5 µl	-----	-----
<i>Tester</i> 2-1 lié à un adaptateur	-----	-----	1,5 µl	-----
<i>Tester</i> 2-2 lié à un adaptateur	-----	-----	-----	1,5 µl
Tampon d'hybridation 4X ¹	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl

¹Composition secrète du tampon (*Clontech*)

La centrifugeuse *Biofuge pico* et le rotor 3325 (*Heraeus*) ont été utilisés pour toutes les étapes de centrifugation. Les tubes sont centrifugés à 9000 rpm pendant 5 sec, incubés à 98°C durant 1,5 min dans le PCR, puis incubés à 68°C durant 8 heures.

2.3.2.3 Deuxième hybridation de la banque de soustraction

Les deux échantillons de la première hybridation sont mélangés ensemble et de l'ADNc de *driver* fraîchement dénaturé est ajouté pour enrichir la fraction des transcrits spécifiques au *tester*. De nouvelles molécules hybrides sont formées (molécules de type E ; voir figure 2.5 à la section 2.3.2). Ces hybrides possédant les deux différents adaptateurs à leurs extrémités, représentent des transcrits spécifiquement exprimés par le *tester*. Dans cette section, deux PCR seront nécessaires, car les échantillons préparés à la section précédente ne doivent pas être enlevés du PCR (un PCR pour maintenir les échantillons à 68°C et un second pour chauffer le mélange de la deuxième hybridation à 98°C). Le mélange des réactifs (voir tableau 2.12) est préparé pour chaque soustraction (directe et inverse).

TABLEAU 2.12
Réactifs utilisés pour la deuxième hybridation

Réactifs	Quantité
ADNc du <i>driver</i>	1 µl
Tampon d'hybridation 4X	1 µl
Eau déionisée et stérile	2 µl

Un µl de ce mélange est ensuite placé dans deux tubes PCR qui sont incubés à 98°C durant 1,5 min dans le deuxième PCR. Ensuite, dans le même embout de pipette, l'échantillon du *driver* dénaturé et la réaction d'hybridation B (voir tableau 2.11) sont prélevés. Le mélange est transféré dans le tube contenant la réaction d'hybridation A (voir tableau 2.11) et est bien mélangé. La même procédure est répétée en parallèle pour les réactions d'hybridation C et D avec le *driver* dénaturé (voir tableau 2.11). Les deux tubes (mélange de A-B avec *driver* et mélange de C-D avec *driver*) sont ensuite incubés à 68°C pour la nuit dans un PCR. Le lendemain, 200 µl de tampon de dilution pH 8.3 (20 mM HEPES pH 6.6, 20 mM NaCl, 0,2 mM EDTA pH 8.0) sont ajoutés, mélangés et le tout est chauffé à 68°C durant 7 min dans un PCR (1 µl de chaque échantillon sera utilisé dans la section 2.3.2.4). Ces échantillons sont conservés à -20°C.

2.3.2.4 Première amplification PCR de la banque de soustraction

Durant la première amplification, seuls les ADNc double brin incluant les deux différents adaptateurs à leurs extrémités sont amplifiés de façon exponentielle. Un μl de chaque échantillon de la deuxième hybridation (dilués à la section 2.3.2.3) et de chaque *Unsubtracted tester control* (dilués à la section 2.3.2.1) est déposé dans quatre tubes. Puis, 1 μl du contrôle PCR d'ADNc soustrait fourni avec la trousse, est déposé dans un cinquième tube. Le contrôle PCR d'ADNc soustrait est un contrôle positif pour l'amplification PCR et contient un mélange soustrait d'ADNc du bactériophage ϕX174 , digéré avec l'enzyme de restriction *HaeIII*. Les réactifs présentés au tableau 2.13 sont alors mélangés.

TABLEAU 2.13

Réactifs utilisés pour le mélange mère de la première amplification PCR

Réactifs	Volume pour une réaction
Eau déionisée et stérile	19,5 μl
Tampon de réaction PCR 10X	0,5 μl
PCR primer 1 (10 μM)	1,0 μl
Mélange d'ADNc polymérases <i>Advantage</i> 50X	0,5 μl

Ensuite, 24 μl de mélange mère sont ajoutés à chaque tube et le mélange est incubé à 75°C durant 5 min dans un PCR pour allonger les adaptateurs et créer le site de liaison pour les amorces PCR (*Nested PCR Primers 1 et 2*). Les cycles PCR utilisés pour la réaction sont les suivants : 94°C durant 25 sec, puis 27 cycles des 3 étapes suivantes, 94°C durant 10 sec, 66°C durant 30 sec et 72°C durant 1,5 min. Les produits PCR sont ensuite analysés en déposant 8 μl des cinq réactions sur un gel d'agarose 2% TBE 1X coloré au bromure d'éthidium et en les faisant migrer à 100 V durant 10 min. Pour le contrôle (contrôle PCR d'ADNc soustrait), les bandes majeures qui apparaissent après 27 cycles doivent correspondre aux fragments de $\phi\text{X174}/\text{HaeIII}$. Les produits PCR de la soustraction apparaissent généralement sous la forme d'une traînée allant de 0,2 à 2 kb, avec ou sans bande distincte. Enfin, 3 μl des cinq produits PCR sont ensuite dilués dans 12 μl d'eau déionisée et ces échantillons sont mis de côté pour le criblage différentiel à

la section 2.3.4. Cependant, 1 µl de ces cinq produits PCR dilués est déposé dans cinq tubes PCR et la deuxième amplification PCR est débutée (voir ci-dessous).

2.3.2.5 Deuxième amplification PCR de la banque de soustraction

La seconde amplification PCR sert à réduire le bruit de fond et enrichir la fraction des transcrits exprimés spécifiquement par le *tester* grâce à l'utilisation des amorces PCR imbriquées (*Nested PCR Primers*; voir tableau 2.14). Les réactifs présentés au tableau 2.14 sont mélangés pour la deuxième amplification PCR.

TABLEAU 2.14

Réactifs utilisés pour le mélange mère de la première amplification PCR

Réactifs	Pour une réaction
Eau déionisée et stérile	18,5 µl
Tampon de réaction PCR 10X	2,5 µl
<i>Nested PCR Primer 1</i> ¹ (10 µM)	1,0 µl
<i>Nested PCR Primer 2</i> ² (10 µM)	1,0 µl
Mélange de dNTP (10 mM chaque)	0,5 µl
Mélange d'ADNc polymérases <i>Advantage</i> 50X	0,5 µl

¹5'-TCGAGCGGCCCGCCGGCAGGT-3'

²5'-AGCGTGGTCGCGCCGAGGT-3'

Ensuite, 24 µl de mélange mère sont ajoutés à chaque échantillon et les cycles PCR utilisés pour la réaction sont les suivants : 11 cycles des 3 étapes suivantes : 94°C durant 10 sec, 68°C durant 30 sec et 72°C durant 1,5 min. Puis, 8 µl de ces produits PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% TBE 1X coloré au bromure d'éthidium, à 100 V pendant 20 min. Le patron d'électrophorèse obtenu est comparé à celui présenté par la compagnie *Clontech* dans son protocole (voir figure 6, page 32 du protocole PT1117-1), auquel il doit être comparable même si quelques bandes additionnelles peuvent apparaître. On considère que la soustraction a été efficace lorsque le patron de bandes du contrôle PCR d'ADNc non soustrait est différent de celui du contrôle PCR d'ADNc soustrait. Les échantillons obtenus des soustractions (directe et inverse) et les *Unsubtracted tester controls*, apparaissent cependant généralement sous la

forme d'une traînée, avec ou sans bande distincte. Il doit y avoir une différence dans le patron de traînée des *Unsubtracted tester controls* versus les échantillons soustraits pour conclure que la soustraction a été efficace. Les produits sont conservés à -20°C durant l'analyse PCR de l'efficacité de la soustraction qui sera présentée à la prochaine section (2.3.2.5.1).

2.3.2.5.1 Analyse PCR de l'efficacité de la soustraction

L'efficacité de la soustraction est estimée en comparant l'abondance d'ADNc connus avant et après la soustraction. Cette analyse est effectuée avec un gène exprimé chez les deux types cellulaires (actine). Les produits PCR soustraits (soustractions directe et inverse) et les *Unsubtracted tester controls* sont dilués dans 10 volumes d'eau déionisée et combinés avec les réactifs présentés au tableau 2.15.

TABLEAU 2.15

Réactifs utilisés pour l'analyse PCR de l'efficacité de la soustraction

Réactifs	tube #1	tube #2	tube #3	tube #4
ADNc dilué de la soustraction directe	1,0 μl	----	----	----
<i>Unsubtracted tester control 1</i> dilué	----	1,0 μl	----	----
ADNc dilué de la soustraction inverse	----	----	1,0 μl	----
<i>Unsubtracted tester control 2</i> dilué	----	----	----	1,0 μl
Amorce pour l'actine 3' (10 μM)	1,2 μl	1,2 μl	1,2 μl	1,2 μl
Amorce pour l'actine 5' (10 μM)	1,2 μl	1,2 μl	1,2 μl	1,2 μl
Eau déionisée et stérile	22,4 μl	22,4 μl	22,4 μl	22,4 μl
Tampon de réaction PCR 10X	3,0 μl	3,0 μl	3,0 μl	3,0 μl
Mélange de dNTP (10mM)	0,6 μl	0,6 μl	0,6 μl	0,6 μl
Mélange d'ADNc polymérases <i>Advantage</i> 50X	0,6 μl	0,6 μl	0,6 μl	0,6 μl

Les cycles PCR utilisés pour la réaction sont les suivants : 18 cycles des 3 étapes suivantes, 94°C durant 30 sec, 60°C durant 30 sec et 68°C durant 2 min. Une aliquote de 5 μl de chaque tube (#1-4, tableau 2.15) est prélevée et la réaction PCR de chaque tube est remise en marche pour 5 cycles supplémentaires. Une aliquote de 5 μl de chaque tube est de nouveau prélevée et la réaction PCR de chaque tube est remise en marche

pour 5 cycles supplémentaires. Encore une fois, une aliquote de 5 µl de chaque tube est prélevée et la réaction PCR de chaque tube est remise en marche pour 5 cycles supplémentaires. Un dernier aliquot de 5 µl est recueilli et conservé. On fait migrer les aliquotes recueillies aux cycles 18, 23, 28 et 33 sur gel d'agarose 2% TBE 1x coloré au bromure d'éthidium à 100 V durant 5 min. Le résultat obtenu est comparé à celui fourni dans le protocole de la compagnie *Clontech* (voir figure 2.8).

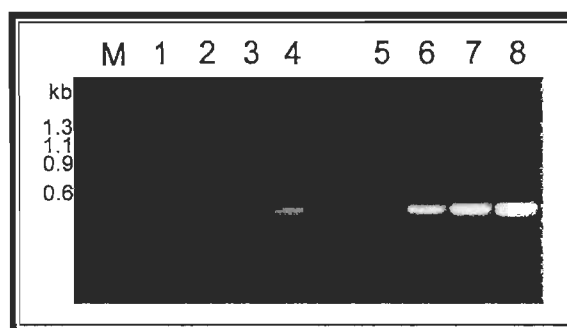


FIGURE 2.8 : Résultat typique de l'analyse PCR de l'efficacité de la soustraction. Image tirée du site Internet <http://www.clontech.com>. (1-4) ADNc soustrait aux cycles 18, 23, 28 et 33, (5-8) ADNc non soustrait aux cycles 18, 23, 28 et 33, (M) marqueur.

Dans cette figure, le produit PCR pour l'actine apparaît après 18-23 cycles dans les échantillons d'ADNc non soustraits (*Unsubtracted tester controls*; puits #5-8), mais seulement 15 cycles plus tard dans les échantillons d'ADNc soustraits (puits #1-4). Cette différence dans le nombre de cycles requis pour une amplification équivalente du produit PCR dans les échantillons soustraits et non soustraits correspondants reflète l'efficacité de la soustraction. En effet, il doit y avoir une différence de 5 à 15 cycles entre ces deux types de préparations pour confirmer que la soustraction a été efficace, une différence de cinq cycles correspondant grossièrement à un enrichissement de l'ADNc par un facteur de vingt. La soustraction n'a pas été efficace si on obtient moins de cinq cycles de différence. Dans ce cas, il devient impossible d'analyser de façon valable les clones obtenus comme étant spécifiques au *tester*, car beaucoup de séquences communes aux deux types de cellules seront présentes dans le produit PCR de la soustraction (faux positifs).

2.3.3 Clonage du produit PCR de la banque de soustraction directe (« lignée TP31 – MCN »)

Le clonage du produit PCR de la banque de soustraction directe (« lignée TP31 – MCN »), qui contient un grand nombre de transcrits, dans le vecteur *pGEM-T Easy* permet de créer une librairie de clones candidats qui sont spécifiquement exprimés par la lignée TP31. Cette librairie sert à éliminer les faux positifs présents dans la banque de soustraction à l'aide du criblage différentiel subséquent.

2.3.3.1 Purification du produit PCR de la banque de soustraction directe

Le produit PCR de la banque de soustraction « lignée TP31 – MCN » est purifié à l'aide de la trousse *NucleoSpin Extractor* de la compagnie *Clontech*. La quantité d'ADNc est dosée par spectrophotométrie (voir section 2.3.1.1).

2.3.3.2 Clonage du produit PCR de la banque de soustraction directe

Le système de clonage *pGEM-T Easy Vector*, ainsi que le protocole utilisé proviennent de la compagnie *Promega* (voir figure 2.9). Dans un microtube de 1,5 ml, sont déposés 3 µl du produit PCR purifié, 1 µl du vecteur *pGEM-T Easy* (50 ng/µl), 5 µl de tampon de ligation rapide pour la T4 ADN ligase 2X (60 mM Tris-HCl pH 7.8, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10% polyéthylène glycol) et 1 µl de T4 ADN ligase (3 U/µl). Cette solution est bien mélangée par pipettage, puis incubée pendant 18 heures à 4°C (voir figure 2.9A). Une fois la ligation terminée, la transformation est effectuée en utilisant la souche de bactéries compétentes *E. coli DH5α*. Ainsi, pour la transformation, 50 µl d'une solution bactérienne d'*E. coli DH5α* et 2 µl du produit de ligation sont ajoutés à un microtube de 1,5 ml déjà placé sur glace. Le microtube repose ainsi sur la glace pendant 20 min, puis les bactéries sont soumises à un choc thermique

de 50 sec à 42°C, suivi d'une incubation de 2 min sur glace. Ensuite, 950 µl de milieu SOC (SOC : 20 g/l bacto-tryptone, 5 g d'extrait de levure, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM glucose, 20 mM Mg²⁺ solution mère (Mg²⁺ solution mère : 1 M MgCl₂, 1 M MgSO₄), pH 7.0) sont ajoutés à cette solution contenant les bactéries.

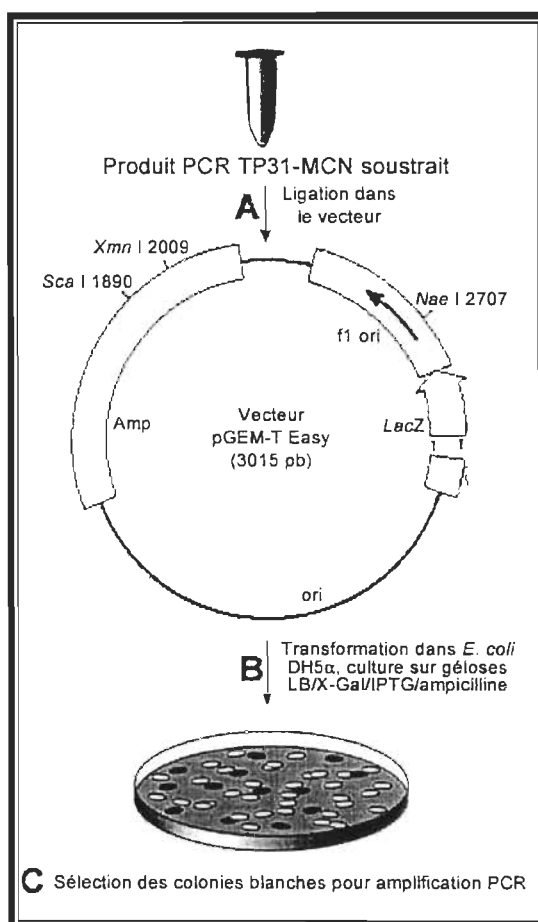


FIGURE 2.9 : Clonage du produit PCR « lignée TP31 – MCN » soustrait. Modification d'une image tirée du site Internet <http://www.promega.com>.

Cette solution bactérienne est incubée à 37°C pendant 1h30 avec agitation (150 rpm) dans un incubateur orbital (voir figure 2.9B). Enfin, 250 µl de cette culture bactérienne sontensemencés sur chacune des quatre géloses LB/X-Gal/IPTG/ampicilline préalablement réchauffées à la température ambiante (gélose LB/X-Gal/IPTG/ampicilline : 10 g/l bacto-tryptone, 5 g/l d'extrait de levure, 5 g/l NaCl, 0,5 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside), 80 µg/ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside), 100 µg/ml d'ampicilline). Ces géloses sont incubées

pendant une nuit à 37°C, puis chaque colonie blanche est repiquée. Ce sont les colonies blanches qui sont sélectionnées puisqu'elles contiennent l'insert (le produit PCR ; voir figure 2.9C). En fait, cet insert vient s'insérer dans le gène de la bêta-galactosidase, ce qui abolit son expression et empêche l'hydrolyse de l'IPTG qui est responsable de la formation d'un produit bleu insoluble. Ce produit insoluble n'étant pas présent dans ces colonies, elles demeurent blanches.

2.3.4 Criblage différentiel de la librairie de clones candidats

La trousse *PCR-Select Differential Screening* et le protocole utilisé proviennent de la compagnie *Clontech*. Le produit PCR de la soustraction « lignée TP31 – MCN » peut contenir certains ADNc communs au *tester* et au *driver*. Cela peut arriver quand très peu de types d'ARNm sont exprimés différenciellement dans le *tester* et le *driver*. En général, moins il y a d'ARNm exprimés différenciellement, moins il y a de différence quantitative dans l'expression et plus il y a de bruit de fond. Lorsque le bruit de fond est élevé, effectuer un criblage différentiel permet de le minimiser avant d'effectuer des amplifications PCR avec les clones sélectionnés, en utilisant l'ADNc de différents tissus normaux et lignées cancéreuses. La production de sondes radioactives à partir des produits PCR de la soustraction directe (« lignée TP31 – MCN »), de la soustraction inverse (« MCN – lignée TP31 ») et de l'ADNc de la lignée TP31 et des MCN, ainsi que l'hybridation de ces sondes avec des membranes contenant les clones candidats de la librairie permet l'élimination des faux positifs éventuellement présents dans la banque de soustraction « lignée TP31 – MCN ». Cette procédure inclut les étapes suivantes : amplification des inserts d'ADNc par PCR (section 2.3.4.1), préparation des membranes (section 2.3.4.2), préparation des sondes d'ADNc (section 2.3.4.3) et hybridation des sondes marquées avec les membranes (section 2.3.4.4).

2.3.4.1 Amplification des inserts d'ADNc par PCR

Quatre cent quatre-vingt colonies blanches ont été prélevées sur les quatre géloses ensemencées. Chaque colonie blanche contient un clone différent (cependant, il peut y avoir quelques colonies qui possèdent le même clone) et en repiquant toutes les colonies blanches, nous augmentons le nombre de clones qui seront amplifiés. Chaque colonie est diluée dans 100 µl de milieu LB/ampicilline dans une plaque à 96 puits (cinq plaques à 96 puits au total) qui est ensuite incubée à 37°C toute la nuit avec agitation à 150 rpm dans un incubateur orbital. Les réactifs présentés au tableau 2.16 pour l'amplification des inserts d'ADNc sont mélangés (voir tableau 2.16). Ensuite, 1 µl de chaque culture bactérienne contenue dans les puits est mélangé avec 19 µl de ce mélange mère. Les cycles PCR utilisés pour les réactions sont les suivants : 94°C durant 30 sec, puis 23 cycles des 2 étapes suivantes : 95°C durant 10 sec, 68°C durant 3 min. Enfin, 5 µl de chaque réaction PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% à 110 V durant 30 min.

TABLEAU 2.16
Réactifs utilisés pour l'amplification des inserts d'ADNc

Réactifs	Pour une réaction
Tampon de réaction PCR 10X	2,0 µl
<i>Nested PCR Primer 1</i> (5'-TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3')	0,6 µl
<i>Nested PCR Primer 2</i> (5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3')	0,6 µl
Mélange de dNTP (10 µM)	0,4 µl
Eau déionisée et stérile	15,2 µl
Mélange d'enzymes PCR 50X	0,2 µl

Cette étape permet de vérifier la présence d'un insert dans chaque colonie, d'amplifier cet insert et de déterminer sa longueur (voir figure 2.10). Trois résultats différents sont possibles : (1) le clone contient un insert dont nous pouvons déterminer la longueur (voir figure 2.10A) et ces clones sont conservés pour la suite du criblage différentiel, (2) le clone ne contient aucun insert (voir figure 2.10B) et ces clones sont rejetés et (3) le clone contient plus d'un insert (voir figure 2.10C) et ces clones sont également rejetés (faux positifs).

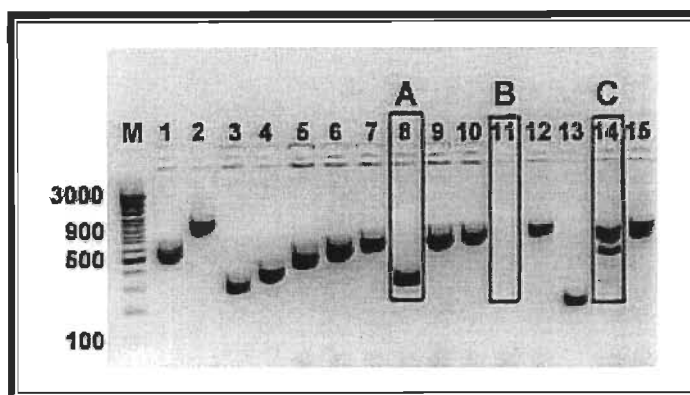


FIGURE 2.10 : Résultat typique de l'amplification des inserts d'ADNc. (A) clone contenant un insert, (B) clone contenant aucun insert, (C) clone contenant plus d'un insert, (M) marqueur.

2.3.4.2 Préparation des membranes pour le criblage différentiel

Cinq μ l de chaque clone amplifié à la section précédente sont combinés avec 5 μ l de NaOH 0,6 N (fraîchement fait ou fraîchement dilué de la solution mère) dans une nouvelle plaque à 96 puits. Le NaOH va dénaturer l'ADNc pour favoriser son hybridation. Le tout est mélangé pendant 30 sec en agitant la plaque dans un incubateur orbital. Ensuite, 1 μ l de chaque échantillon dénaturé contenu dans chaque puits est déposé sur une membrane de nylon à l'aide d'une pipette à douze canaux (huit rangées de douze clones par membrane); 4 membranes identiques sont préparées pour l'hybridation avec les quatre sondes différentes (produit PCR de la soustraction directe, produit PCR de la soustraction inverse, ADNc de la lignée TP31 et ADNc des MCN; voir la section 2.3.4.3 pour la préparation des sondes). Les membranes sont neutralisées pendant 4 min dans du Tris-HCl (0,5 M, pH 7.5) et rincées 2 fois avec de l'eau déionisée. L'ADNc est alors fixé à la membrane par un traitement à la lumière UV (*UV cross-linker*, compagnie VWR; 120 μ J durant 2 min). Les membranes sont ensuite conservées au réfrigérateur entre deux cartons et enveloppées dans du papier d'aluminium jusqu'à leur utilisation.

2.3.4.3 Préparation des sondes d'ADNc pour le criblage différentiel

Dans des tubes séparés de 0,5 ml qui se vissent, 3 µl (20-90 ng) du produit PCR de la soustraction directe (« lignée TP31 – MCN »), du produit PCR de la soustraction inverse (« MCN – lignée TP31 »), de l'ADNc de la lignée TP31 et de l'ADNc des MCN sont mélangés avec 6 µl d'eau déionisée. Le mélange est dénaturé en chauffant durant 8 min à 95°C et ensuite refroidi sur glace. Les réactifs du mélange mère présentés au tableau 2.17 servant à la préparation des sondes, sont mélangés et ajoutés à chaque tube.

TABEAU 2.17

Réactifs utilisés pour le mélange mère servant à la préparation des sondes

Réactifs	Pour une réaction
Tampon de réaction (dCTP) ¹	3 µl
Mélange d'amorces aléatoires ²	2 µl
[α- ³² P]dCTP (50µCi, 3000Ci/mmol, solution aqueuse)	5 µl
Enzyme <i>Klenow</i> (exo ⁻ , 2-5 U/µl)	1 µl

¹Composition : 333 mM Tris-HCl pH 8.0, 33.3 mM MgCl₂, 10 mM 2-mercaptoéthanol, 170 mM dATP, 170 mM dGTP, 170 mM dTTP.

²Composition : 0,9 mg/ml nonamères aléatoires, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mg/ml BSA.

Les tubes sont incubés à 37°C durant 30 min et les réactions sont arrêtées en ajoutant 5 µl de solution d'arrêt (0,1 M EDTA, 500 µg/ml d'ARNt de levure). Les sondes sont finalement purifiées en utilisant des colonnes *Chroma Spin 100* comme décrit à la section 2.3.1.2 et l'activité spécifique de chaque sonde est déterminée à l'aide d'un compteur à scintillations β (*Wallac 1411, Liquid Scintillation Counter*). L'activité spécifique de chaque sonde est ajustée à 5x10⁷ cpm avant d'être utilisée à la section 2.3.4.4 pour l'étape d'hybridation des sondes marquées avec les membranes.

2.3.4.4 Hybridation des sondes marquées avec les membranes

La solution d'hybridation suivante est élaborée pour chaque membrane préparée à la section 2.3.4.2: 50 µl de 20X SSC (*Sodium chloride/Sodium citrate* : 3 M NaCl, 0,3 M

Na₃citrate, pH 7.0) et 50 µl de solution bloquante (10 mg/ml d'ADN de sperme de saumon, 0,3 mg/ml d'oligonucléotides correspondant aux *Nested PCR Primers* et à leurs séquences complémentaires) sont bien mélangés, bouillis durant 5 min, puis refroidis sur glace et combinés avec 5 ml de solution d'hybridation *ExpressHyb* de la compagnie *Clontech* (composition secrète). Ensuite, chaque membrane est placée dans une bouteille à hybridation et la solution d'hybridation préparée ci-dessus est ajoutée. Les membranes sont alors préhybridées durant 60 min à 72°C dans un four à hybridation. Puis, la sonde d'hybridation est préparée: 50 µl de 20X SSC, 50 µl de solution bloquante et la sonde purifiée (5×10^7 cpm/membrane) sont mélangés. Il faut s'assurer d'avoir le même nombre de cpm pour chacune des quatre sondes. Le mélange est bouilli durant 5 min, puis placé sur glace. Ensuite, le mélange est ajouté à chaque contenant d'hybridation en évitant d'ajouter la sonde directement sur la membrane (il faut déposer le mélange au fond de la bouteille à l'aide d'une pipette). Les membranes sont hybridées à 72°C pendant toute la nuit. Au matin, les solutions de rinçage à faible stringence (2X SSC/0,5% SDS) et à stringence élevée (0,2X SSC/0,5% SDS) sont réchauffées à 68°C dans un four à hybridation et elles sont conservées à cette température tout au long du rinçage. Les membranes sont d'abord rincées quatre fois durant 20 min avec la solution de rinçage à faible stringence à 68°C, puis deux fois durant 20 min avec la solution de rinçage à stringence élevée à 68°C. Finalement, les quatre membranes sont collées sur un carton et exposées dans une cassette entre 60 et 120 heures avec un écran à phosphore *Biorad*, puis les membranes sont analysées à l'aide de l'appareil *Personal Molecular Imager FX system* de *Biorad*. Les résultats sont comparés à la figure 2.11. Les lettres et les chiffres représentent les huit rangées de douze clones fixés sur chaque membrane. Cette figure montre l'hybridation de chacune des quatre sondes marquées à des membranes possédant à leur surface les mêmes 96 clones : (A) la sonde de la soustraction directe qui contient les transcrits spécifiques au *tester*, (B) la sonde du *tester* qui représente tous les transcrits présents chez le *tester* avant la soustraction, (C) la sonde de la soustraction inverse qui contient les transcrits spécifiques au *driver* et (D) la sonde du *driver* qui représente tous les transcrits présents chez le *driver* avant la soustraction. Les flèches indiquent la position des différents exemples de clones qui seront conservés ou non pour l'étape de séquençage et d'analyse bioinformatique (voir tableau 2.18).

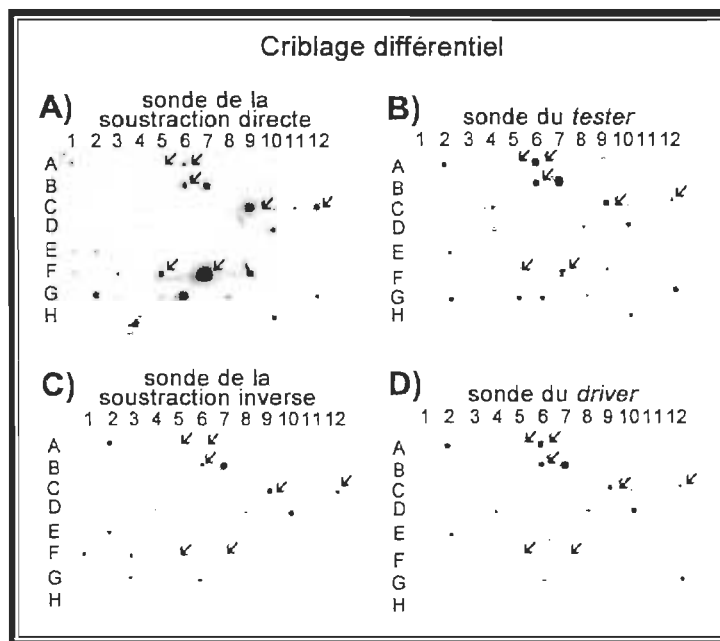


FIGURE 2.11 : Résultat typique d'un criblage différentiel. Image tirée du site Internet <http://www.clontech.com>. (A) membrane hybridée avec la sonde de la soustraction directe, (B) membrane hybridée avec la sonde du *tester*, (C) membrane hybridée avec la sonde de la soustraction inverse, (D) membrane hybridée avec la sonde du *driver*.

Les clones qui seront conservés pour le séquençage sont ceux classés dans les deux premières catégories. D'abord, il y a les clones qui s'hybrident avec la sonde de la soustraction directe et la sonde du *tester* seulement, comme par exemple le clone F7, qui correspondent, dans 95% des cas, à des gènes spécifiques au *tester* (voir tableau 2.18). Puis, il y a les clones qui s'hybrident seulement avec la sonde de la soustraction directe, comme le clone F5, qui sont des transcrits peu abondants spécifiques au *tester* qui ont été enrichis durant la soustraction. Cependant, ces clones peuvent être occasionnellement des artéfacts (voir tableau 2.18).

TABLEAU 2.18
Interprétation des résultats de criblage différentiel

Membranes				Interprétation
A	B	C	D	
¹ +	+	² -	-	Les clones qui s'hybrident seulement avec la sonde de la soustraction directe et la sonde du <i>tester</i> correspondent toujours (95% de probabilité) à des gènes spécifiques au <i>tester</i> (ex. clone F7).
+	-	-	-	Les clones qui s'hybrident seulement avec la sonde de la soustraction directe sont, la plupart du temps, des gènes spécifiques au <i>tester</i> (ex. clone F5). Ces clones correspondent typiquement à des transcrits peu abondants qui ont été enrichis durant la soustraction. Occasionnellement, ces clones peuvent représenter des artéfacts.
+	+	-	+	Les clones qui s'hybrident avec toutes les sondes sauf celle de la soustraction inverse, sont difficiles à interpréter. Des analyses en <i>Northern</i> montrent souvent que ces clones sont des variants épissés ou encore possédant une mutation spécifique au <i>tester</i> (ex. clone A6).
³ ++	+	+	+ ou ⁴ -	Les clones qui s'hybrident aux deux sondes des soustractions, mais avec une intensité de signal différent de plus de cinq fois (ex. clone C9) sont probablement des clones surexprimés par le <i>tester</i> . Les clones qui s'hybrident aux deux sondes des soustractions, mais avec une intensité de signal différent de moins de trois fois (ex. clone C12) ne sont pas surexprimés par le <i>tester</i> . Ils proviendraient de fluctuations aléatoires dans l'efficacité des deux soustractions.
+	+	+	+	Les clones qui s'hybrident avec toutes les sondes à la même intensité de signal sont non spécifiques au <i>tester</i> (ex. clone B6).
-	-	-	-	Les clones qui n'ont aucun signal d'hybridation représentent des ADNc non spécifiques au <i>tester</i> , présents à des niveaux trop bas pour s'hybrider au clone correspondant (ex. clone A5).

¹Hybridation de la sonde avec le clone

²Aucune hybridation de la sonde avec le clone

³Forte hybridation de la sonde avec le clone

⁴Hybridation ou aucune hybridation de la sonde avec le clone

2.3.5 Purification des produits PCR des clones spécifiques à la lignée cancéreuse TP31 pour effectuer leur séquençage

Le protocole utilisé est celui de la trousse *QIAquick PCR Purification* de la compagnie *QIAGEN*. En résumé, l'adsorption des acides nucléiques à la surface du gel de silice contenu dans la colonne se fait seulement en présence d'une forte concentration de sels chaotropiques, lesquels modifient la structure de l'eau. L'adsorption de ces acides nucléiques dépend également du pH (pH optimum : 7.5). Leur élution est cependant plus efficace en présence d'une faible concentration de sels et d'un pH basique. Cette purification permet d'isoler les fragments de 100 pb à 10 kb et d'éliminer les amorces, les nucléotides, la polymérase, les détergents et les sels grâce à la colonne *QIAquick spin* de *QIAGEN*. La quantité d'ADNdb (ADN double brin) contenue dans l'éluat est dosée par spectrophotométrie comme décrit à la section 2.3.1.1. Chaque échantillon d'ADNdb, ajusté à une concentration de 2 ng/μl, et les amorces PCR spécifiques (*Nested PCR Primers 1 ou 2*), ajustées à une concentration de 1,5 μM, sont envoyés au Service d'Analyse et de Synthèse d'Acides Nucléiques de l'Université Laval (Québec, QC, Canada) pour séquençage.

2.3.6 Analyse bioinformatique des clones spécifiques à la lignée TP31

L'analyse bioinformatique comporte plusieurs étapes différentes. La plupart des approches présentées ont été effectuées grâce à divers algorithmes de recherche disponibles sur Internet. Le but de l'analyse bioinformatique est de repérer, parmi les millions de séquences des banques de données, celles présentant des similitudes avec les séquences obtenues à partir de la banque de soustraction. Ces séquences sont ensuite minutieusement analysées afin d'identifier un nouveau gène spécifique au mélanome uvéal. Le premier algorithme utilisé est le *basic local alignment search tool* (BLAST) qui permet, comme son nom l'indique, de repérer des identités de séquence entre la séquence soumise et les diverses séquences des banques de données de la *National Center for Biotechnology Information* (NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Le deuxième algorithme utilisé est le *Ensembl* (http://www.ensembl.org/homo_sapiens) né d'une association entre le *Sanger Institute* et le *European Molecular Biology Laboratory* et le troisième est le *National Eye Institute basic local alignment search tool* (*NEIBLAST* : <http://neiblast.nei.nih.gov>). Pour débiter, seuls les clones dont les séquences correspondaient à des ESTs ou à des HTGS, ou encore les séquences qui n'avaient pas d'homologues dans les banques de données, ont été sélectionnés pour les amplifications PCR avec les différents tissus normaux et les lignées cancéreuses (voir section 2.3.7). La probabilité que ces clones soient spécifiques au mélanome uvéal est donc plus grande.

2.3.7 RT-PCR en utilisant l'ARN de différents tissus normaux et de lignées cancéreuses

L'utilisation de l'ADNc d'une grande variété de tissus normaux et lignées cancéreuses a permis de vérifier si les clones intéressants sélectionnés sont spécifiques au mélanome uvéal.

2.3.7.1 Préparation de l'ARN et de l'ADNc des MCN, des lignées cancéreuses et des tissus normaux

La préparation de l'ARN et de l'ADNc des MCN, des lignées cancéreuses et des tissus normaux est nécessaire pour valider par PCR la spécificité des clones obtenus pour le mélanome uvéal.

2.3.7.1.1 Extraction de l'ARN des MCN et des lignées cancéreuses

Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans la section 2.3.1.1. L'ARN obtenu est dosé par spectrophotométrie pour déterminer la concentration d'ARN de

chaque tube. Par la suite, on procède à une électrophorèse d'un échantillon d'ARN de chaque type de cellule (H79, HeLa, Jurkat, SP6.5, SP8.0 et TP31) sur un gel d'agarose 1,5% TBE 1X coloré au bromure d'éthidium, à 100 V durant 20 min, afin de vérifier l'intégrité de l'ARN.

2.3.7.1.2 Extraction de l'ARN des tissus normaux

Des morceaux d'organes (cerveau, utérus, poumons, foie, cœur, rate, reins, pancréas, muscle et MCN), conservés à -80°C dans du *RNA Later* (*Ambion*; composition secrète; solution qui inactive les ARNases et stabilise l'ARN), ont été prélevés au cours de l'autopsie d'une femme de 81 ans. L'extraction de l'ARN est réalisée sur glace afin de prévenir toute dégradation de l'ARN. Le protocole qui suit provient de la compagnie *Sigma* et est une amélioration de la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987). La centrifugeuse *Biofuge pico* et le rotor 3325 (*Heraeus*) ont été utilisés pour toutes les étapes de centrifugation. Des petits morceaux de chaque organe sont immergés dans un volume de 2 ml de *Tri Reagent* (solution d'homogénéisation qui contient du phénol et de la GITC) dans un tube stérile (traité contre les ARNases). À l'aide d'un homogénéisateur à tissus, les morceaux d'organes sont dissous dans le *Tri Reagent* et l'homogénat est centrifugé à 13 000 g durant 10 min à 4°C . Le surnageant est transféré dans un microtube stérile et laissé à température ambiante pendant 5 min. Ensuite, 200 μl de chloroforme sont ajoutés au surnageant qui a été récupéré. Le microtube est vortexé vigoureusement, puis laissé à température ambiante pendant 10 min pour être ensuite centrifugé à 13 000 g durant 14 min à 4°C . La phase aqueuse ainsi obtenue est transférée dans un nouveau microtube auquel sont ajoutés 500 μl d'isopropanol. Ce mélange est ensuite vortexé et laissé durant 10 min à température ambiante, puis centrifugé à 13 000 g pendant 10 min à 4°C pour permettre l'élimination du surnageant et le rinçage du culot. Le culot obtenu est rincé avec 1 ml d'éthanol 75%, vortexé, centrifugé à 7 500 g pendant 5 min à 4°C , séché par évaporation à l'air et, enfin, resuspendu dans de l'eau déionisée traitée contre les ARNases. L'ARN obtenu est dosé par spectrophotométrie

pour déterminer sa concentration dans chaque tube comme décrit dans la section 2.3.1.1. Finalement, on fait migrer un échantillon d'ARN de chaque tissu sur un gel d'agarose 1,5% TBE 1X coloré au bromure d'éthidium, à 100 V pendant 20 min, pour vérifier l'intégrité de l'ARN.

2.3.7.2 Transcription de l'ARN des tissus normaux et des lignées cancéreuses en ADNc

Le protocole suivi est celui indiqué par *MBI Fermentas* pour l'utilisation de la transcriptase inverse *RevertAid H minus M-MuLV*. L'ADNc ainsi obtenu est prêt à être utilisé pour les amplifications PCR. La quantité d'ADNc obtenue dans chacun des tubes est déterminée par spectrophotométrie, comme décrit à la section 2.3.1.1.

2.3.7.3 Amplifications PCR avec l'ADNc de tissus normaux et de lignées cancéreuses

Les réactions PCR ont été réalisées en variant divers paramètres. Pour l'ensemble des réactions PCR, 3 ng d'ADNc de chaque tissu normal et de chaque lignée cancéreuse ont été utilisés. La polymérase utilisée est celle de *MBI Fermentas* (*Taq* ADN polymérase) et le tampon de PCR est celui contenant le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (tampon de réaction PCR 10X avec $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 750 mM Tris-HCl pH 8.8, 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% *Tween* 20) fourni avec l'enzyme. Les concentrations finales des réactifs utilisés sont présentées dans le tableau 2.19 et les séquences des différentes amorces utilisées lors des réactions PCR sont énumérées dans le tableau 2.20.

Les clones indiqués dans le tableau 2.20 ont été choisis parmi ceux qui correspondaient à des ESTs ou HTGS, ou encore à des séquences inconnues. Voici les conditions utilisées pour la majorité des réactions PCR réalisées : 3 min à 95°C, puis 30 cycles des trois étapes suivantes, 30 sec à 94°C, 2 min à 58°C, 2,15 min à 72°C et enfin,

une dernière étape de 7 min à 72°C. On fait ensuite migrer les différents produits PCR obtenus sur un gel d'agarose 2% TBE 1X coloré au bromure d'éthidium, à 110 V pendant 35 min.

TABLEAU 2.19
Concentrations finales des réactifs utilisés lors des réactions PCR

Réactifs	Concentrations finales
Eau déionisée et stérile	-
Tampon de réaction PCR 10X avec (NH ₄) ₂ SO ₄	1X
Mélange de dNTP (10 mM)	250 µM
Amorce sens (10 µM)	0,5 µM
Amorce antisens (10 µM)	0,5 µM
<i>Taq</i> ADN polymérase (5 U/µl)	1 U/20 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 mM
ADNc	3 ng

TABLEAU 2.20
Compilation des différentes amorces utilisées pour les amplifications PCR

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5'-3')	T _m (°C)	Nombre de pb attendu
actine 5'	TGTCCACCTTCCAGCAGATGT	67	600
actine 3'	CACTCCCAGGGAGACCAAAA	66	
intégrine α6 5' ¹	CAAGATGGCTACCCACATAT	65	210
intégrine α6 3' ¹	CTGAATCTGAGAGGGAACCA	63	
clone G2-8 5'	TCCTAGCTCAGGATGAACGCT	67	280
clone G2-8 3'	TCTCGGCCCCGGCTAAACAT	66	
clone G2-13 5'	TGGGGTTGAAGTGAACATGA	63	253
clone G2-13 3'	GCGGCCGAGGTACAAAATA	65	
clone G2-15 5'	GACAAGAAGCGTTTGCAATTT	62	862
clone G2-15 3'	TTGGAGCATGAGTAAAACGG	63	
clone G2-44 5'	CAAAGCAAAAAAGCCAAAG	60	431
clone G2-44 3'	AATGTTGCGTGTCTTGACTGT	63	
clone G2-81 5'	AGTGAGGAAGAGCCTCAGTT	65	519
clone G2-81 3'	GTGATGTTTAACGATTTTCGAT	60	

¹ Amorces fournies par Steeve Leclerc du laboratoire du Dr S.L. Guérin.

2.4 IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Cette technique sert à localiser des protéines au sein d'une cellule et nécessite l'utilisation d'un microscope à épifluorescence et d'un anticorps spécifique à la protéine recherchée (anticorps primaire), ainsi que d'un anticorps secondaire spécifique à l'anticorps primaire, marqué avec une sonde fluorescente. Ensuite, les fluorophores qui sont excités par la lumière de la lampe du microscope émettent de la fluorescence et des filtres permettent de sélectionner précisément la longueur d'onde d'émission correspondant au fluorophore utilisé.

2.4.1 Préparation des lamelles

Il s'agit de déposer 2 ml de milieu de culture contenant environ 250 000 cellules sur chaque lamelle (12 mm de diamètre) placée au fond d'une plaque à 24 puits. Les lamelles sont ensuite incubées à 37°C pour permettre l'adhésion des cellules. À confluence, le milieu de culture est aspiré et les lamelles sont rincées deux fois avec du PBS-IF (PBS-IF : 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 6,5 mM Na_2HPO_4 , 0,9 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2). Les cellules sont alors fixées en versant doucement de l'acétone pré-refroidie à -20°C dans les puits contenant les lamelles. La plaque à 24 puits est ensuite placée à -20°C durant 10 min, puis les lamelles sont rincées deux fois au PBS-IF.

2.4.2 Immunofluorescence indirecte des cellules sur lamelles à l'aide de marqueurs cellulaires spécifiques

Les lamelles sont d'abord transférées dans des plaques à 12 puits pour éviter que les anticorps ne se mélangent. Ainsi, les lamelles sont soulevées avec un pic et à l'aide de pinces à bouts fins, elles sont déposées délicatement dans chaque puits, le côté où se trouvent les cellules étant orienté vers le haut. Du PBS-IF est immédiatement versé sur

les lamelles pour éviter que les cellules ne sèchent. La plaque à 12 puits est déposée dans une chambre humide et le liquide autour de chaque lamelle est aspiré. Ensuite, 150 µl de PBS-IF/1% BSA sont déposés sur chaque lamelle et la plaque est incubée à la température ambiante durant 30 min pour bloquer les sites de liaison non spécifiques. À la fin de l'incubation, le PBS-IF/1% BSA est aspiré et les lamelles sont rincées trois fois avec du PBS-IF. Ensuite, 150 µl d'anticorps primaire sont déposés sur les cellules. Les lamelles sont incubées à la température ambiante pendant 45 min, puis rincées trois fois avec du PBS-IF. Finalement, 150 µl d'anticorps secondaire sont déposés sur les lamelles et la plaque est incubée dans une chambre humide à la température ambiante durant 45 min à la noirceur. Les lamelles sont rincées trois fois avec du PBS-IF, puis une dernière fois avec de l'eau déionisée, afin d'enlever les sels du PBS qui cristallisent et cernent les lames. Les contrôles positifs pour chaque marqueur spécifique sont énumérés dans le tableau 2.21, alors que les différents anticorps primaires et secondaires utilisés et leur dilution sont présentés dans le tableau 2.22.

TABLEAU 2.21
Contrôles positifs en immunofluorescence indirecte

Type de cellules	Marqueurs spécifiques
EPR (cellules épithéliales)	Cytokératines ¹
MCN (cellules stromales)	Vimentine
lignée TP31 (mélanome uvéal)	HMB45 ²
lignée HepG2 (carcinome hépatocellulaire)	AFP ³

¹Cet anticorps reconnaît plusieurs cytokératines (1, 5, 6, 7, 8, 10, 11 et 18)

²Melanoma marker clone HMB45

³Alpha-fétoprotéine

Les lamelles sont montées sur le milieu de montage *ProLong* de la compagnie *Biorad* (composition secrète; milieu de montage qui permet de conserver la fluorescence plus longtemps) en plaçant les cellules face à la lame. Les lames sont observées au microscope à épifluorescence (*Nikon Diaphot 300*) à l'aide d'un objectif de 20X. Les images sont prises à l'aide d'un appareil photo numérique (*CoolPix 4500*; *Nikon*).

TABLEAU 2.22
Caractéristiques des anticorps primaires et secondaires utilisés en
immunofluorescence indirecte

Anticorps	Espèce	Dilution	Compagnie
Anti-cytokératines 8,13	souris	1/100	Sigma
Anti-vimentine	chèvre	1/50	ICN
Anti-HMB45	souris	non dilué	Cedarlane
Anti-AFP	souris	1/50	Novocastra
Anti-souris Alexa Fluor 488	chèvre	1/250	Molecular Probes
Anti-chèvre FITC	lapin	1/400	Sigma
Anti-souris TRITC ¹	chèvre	1/128	Sigma

¹Tétraméthylrhodamine isothiocyanate

CHAPITRE 3

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 CARACTÉRISATION DES MCN ET DES LIGNÉES CANCÉREUSES DÉRIVÉES DU MÉLANOME UVÉAL

La caractérisation des MCN et des lignées cancéreuses TP31, SP8.0 et H79 a été réalisée à l'aide de deux approches. D'abord, en comparant leur morphologie en culture (MCN, TP31 et H79) puis, en déterminant leur profil d'expression des intégrines (MCN, TP31, SP8.0 et H79).

3.1.1 Comparaison morphologique entre les MCN et les lignées cancéreuses TP31 et H79

Des images prises en contraste de phase à non confluence (voir figure 3.1A), puis à confluence (voir figure 3.1B) ont permis de comparer la morphologie des MCN avec celles des lignées cancéreuses TP31 et H79. L'utilisation de ces trois types de cellules permet de recréer en quelque sorte l'évolution du mélanome uvéal, de la cellule normale (MCN), à la métastase hépatique (lignée hépatique H79), en passant par la tumeur primaire (lignée cancéreuse TP31). Il faut se rappeler que les mélanomes uvéaux sont classés en trois types, selon le type de cellules qui les composent : fusiformes, épithélioïdes ou mixtes (Spencer, 1986). À non confluence (voir figure 3.1A) et à confluence (voir figure 3.1B), nous pouvons remarquer que les MCN sont pigmentés et qu'ils possèdent de longs prolongements dendritiques partant d'un noyau central proéminent. Ensuite, la lignée cancéreuse TP31 ressemble beaucoup aux MCN, mais ces cellules sont non pigmentées, possèdent des prolongements dendritiques plus courts et un noyau plus volumineux. La lignée hépatique H79 est composée de cellules non pigmentées, avec un noyau encore plus volumineux que la lignée TP31. Nous avons

alors pu confirmer ou déterminer que les MCN sont des cellules fusiformes, que la lignée cancéreuse TP31 est de phénotype mixte, c'est-à-dire qu'elle est composée de cellules fusiformes et épithélioïdes (Beliveau et al., 2000) et que la lignée hépatique H79 est de phénotype épithélioïde. La comparaison de leur morphologie permet déjà de noter des différences au niveau du phénotype, différences qui pourraient se refléter dans les résultats de cytométrie de flux pour la détermination du profil d'expression des intégrines pour chaque stade de progression du mélanome uvéal.

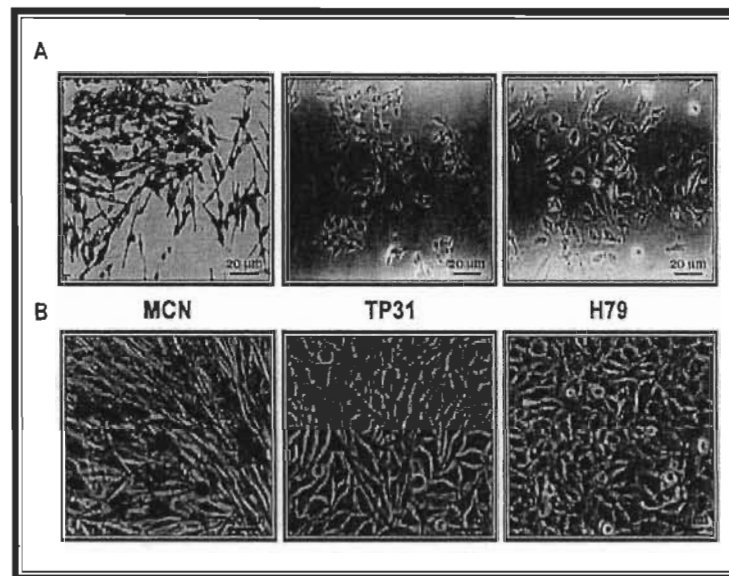


FIGURE 3.1 : Morphologie des MCN et des lignées cancéreuses TP31 et H79 à non confluence (A) et à confluence (B).

3.1.2 Analyse du profil d'expression des intégrines des MCN et des lignées cancéreuses TP31, SP8.0 et H79

Afin de déterminer le profil d'expression des intégrines des MCN et des lignées cancéreuses, des mesures de cytométrie de flux ont été effectuées (voir figures 3.2 à 3.5). La courbe contrôle est représentée par une ligne pointillée. Les résultats des figures 3.2 à 3.5 sont compilés et comparés entre eux dans le tableau 3.1.

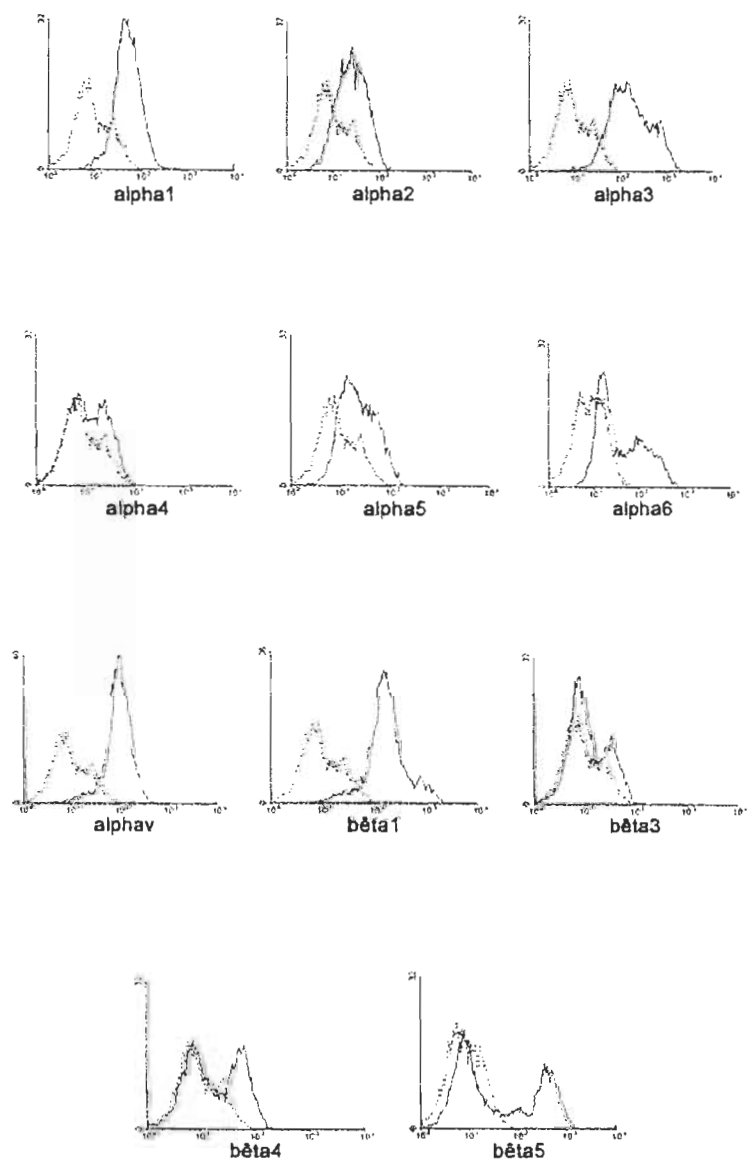


FIGURE 3.2 : Profil d'expression des intégrines des MCN.

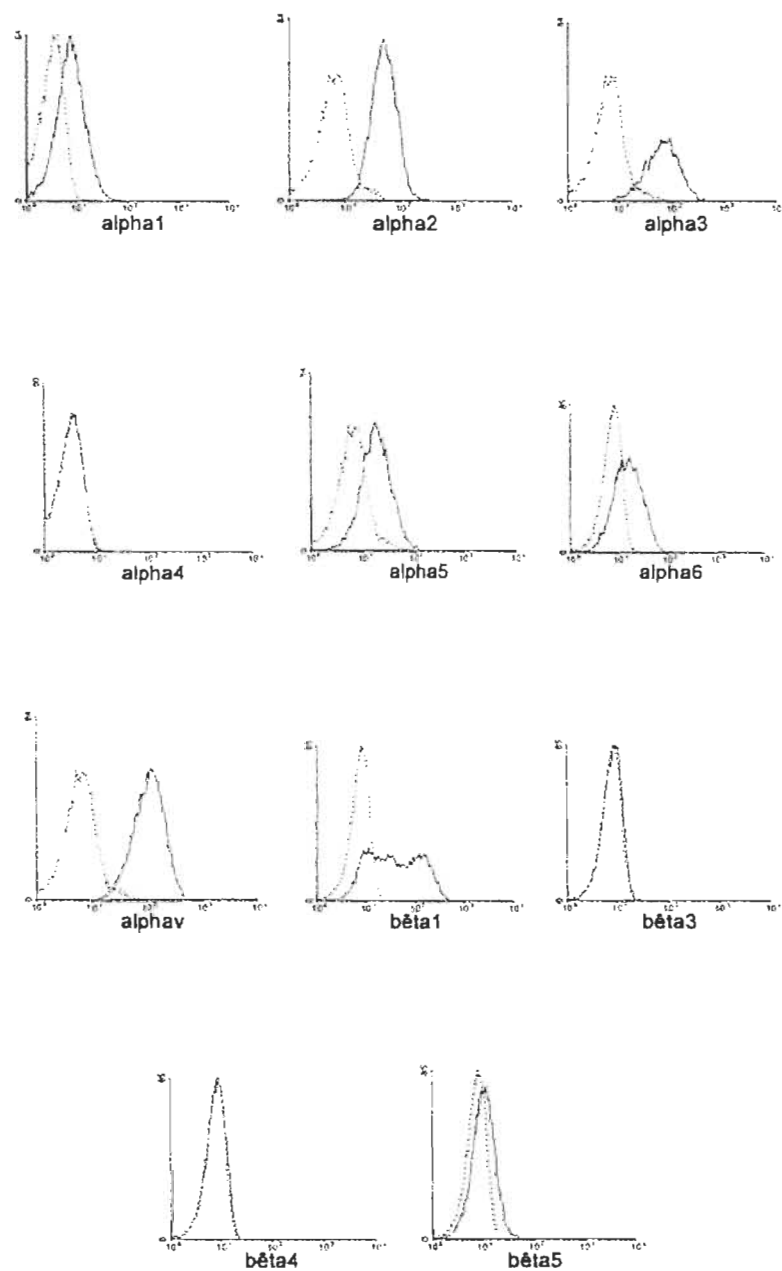


FIGURE 3.3 : Profil d'expression des intégrines de la lignée TP31.

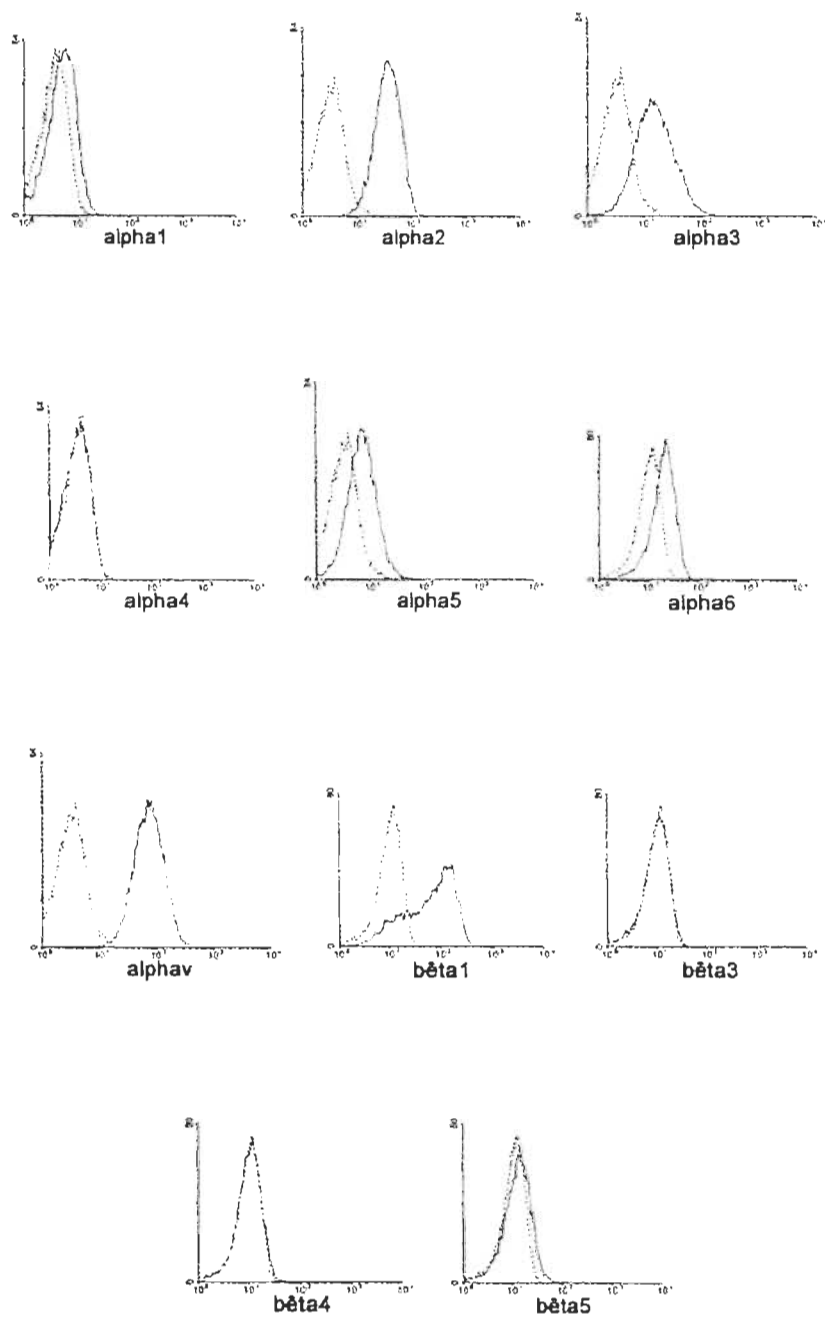


FIGURE 3.4 : Profil d'expression des intégrines de la lignée SP8.0.

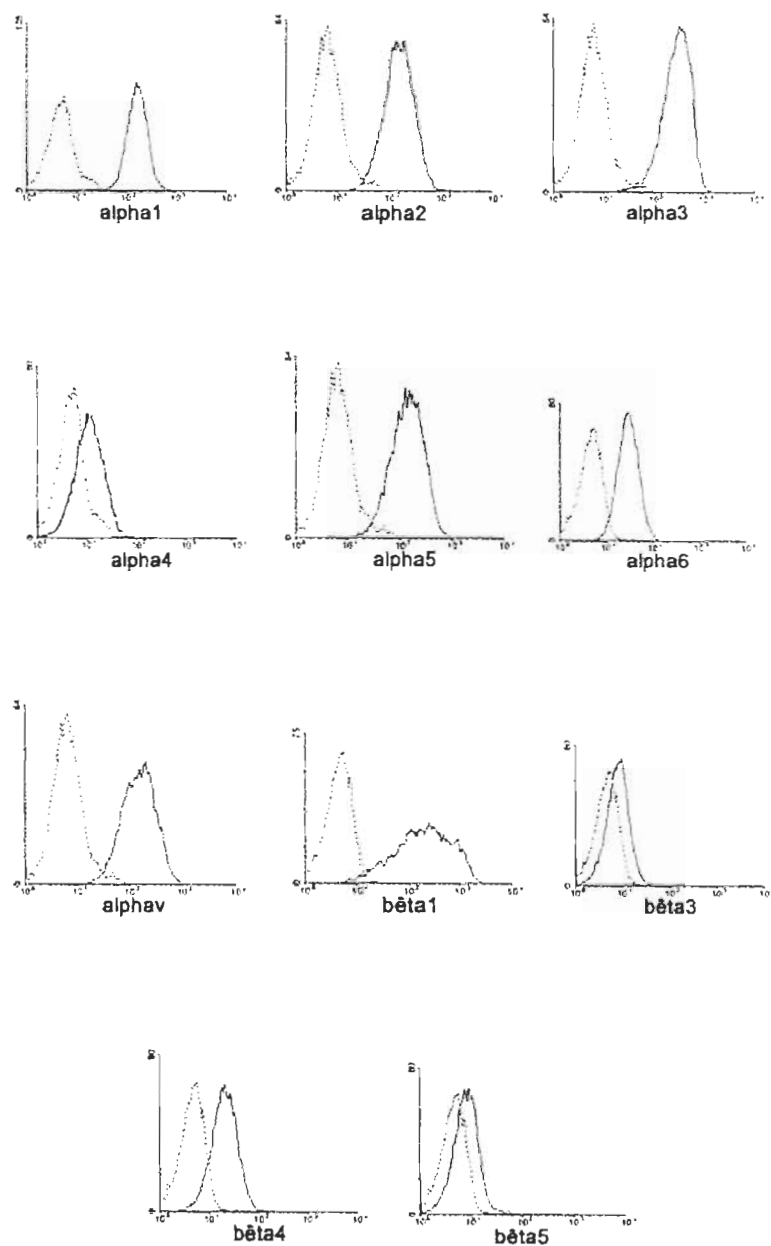


FIGURE 3.5 : Profil d'expression des intégrines de la lignée H79.

Pour confirmer les résultats négatifs, des contrôles positifs ont été effectués pour chaque anticorps dirigé contre les différentes sous-unités d'intégrines. La lignée cancéreuse HeLa a été utilisée comme contrôle positif pour toutes les sous-unités d'intégrines, sauf pour la sous-unité $\alpha 4$ pour laquelle la lignée cancéreuse Jurkat a été utilisée. Les résultats des contrôles positifs ont démontré que tous les anticorps fonctionnaient et qu'ils reconnaissaient leurs antigènes.

TABLEAU 3.1
Profil d'expression des intégrines des MCN et
des lignées cancéreuses TP31, SP8.0 et H79

	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$	αv
MCN	++	+	+++	–	+	++	+++
TP31	+	+++	+++	–	+	++	+++
SP8.0	+	+++	++	–	+	+	+++
H79	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++

	$\beta 1$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$
MCN	+++	–	+	+++
TP31	+++	–	–	+
SP8.0	+++	–	–	+
H79	+++	+	++	+

n=2

Les résultats de cytométrie de flux pour les MCN indiquent que ces cellules, provenant d'un seul donneur, expriment les sous-unités d'intégrines $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$, $\beta 4$ et $\beta 5$ à leur surface, alors que les sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 3$ étaient absentes. Ces résultats concordent avec la littérature, excepté pour les intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$ qui n'avaient pas été observées auparavant et $\alpha v\beta 3$ qui avait déjà été détectée (Elshaw et al., 2001). En effet, des études immunohistochimiques effectuées sur des lamelles de mélanocytes uvéaux normaux en culture ont permis de déterminer qu'ils exprimaient les intégrines $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ et qu'ils n'exprimaient pas les intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$ (Elshaw et al., 2001). Les différences entre ces données de la littérature et les résultats de notre étude peuvent provenir de trois facteurs : (1) la variabilité entre les donneurs, (2) la méthode utilisée, la cytométrie de flux étant plus sensible et plus spécifique que l'immunohistochimie, ou encore (3) les anticorps utilisés.

Les lignées cancéreuses TP31 et SP8.0 dérivées de tumeurs primaires du mélanome uvéal expriment les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$ et $\beta 5$ à leur surface, mais à des niveaux légèrement différents. Les sous-unités $\alpha 4$, $\beta 3$ et $\beta 4$ n'étaient pas exprimées par les deux lignées cancéreuses. Ces résultats diffèrent de la littérature, car $\alpha 4$ et $\alpha v\beta 3$ ont été détectées auparavant dans certaines études sur le mélanome uvéal. En effet, des études immunohistochimiques effectuées sur des lamelles de lignées cellulaires de mélanomes uvéaux en culture ont permis de déterminer que toutes les tumeurs exprimaient les intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$, 70% (7/10 tumeurs testées) exprimaient $\alpha 4\beta 1$ et 60% (6/10 tumeurs testées) exprimaient $\alpha 6\beta 1$ (Elshaw et al., 2001). Une seconde étude immunohistochimique effectuée sur des prélèvements tissulaires issus de mélanomes uvéaux au stade primaire a démontré que toutes les lésions étaient positives pour les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$ et l'intégrine $\alpha v\beta 5$, 75% (24/32 tumeurs testées) pour la sous-unité $\alpha 6$, 25% (8/32 tumeurs testées) pour la sous-unité $\alpha 4$, 16% (5/32 tumeurs testées) pour la sous-unité $\alpha 1$, 9% (3/32 tumeurs testées) pour la sous-unité $\alpha 2$ et aucune lésion n'était positive pour la sous-unité $\beta 4$ et l'intégrine $\alpha v\beta 3$ (Albelda et al., 1990; ten Berge et al., 1993). Une troisième étude immunohistochimique effectuée également sur des prélèvements tissulaires issus de mélanomes uvéaux au stade primaire, a permis de détecter les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$ et $\beta 5$, particulièrement l'intégrine $\alpha v\beta 5$ dans toutes les tumeurs primaires. La majorité des tumeurs exprimaient également la sous-unité $\alpha 6$, tandis que les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 4$ étaient présentes seulement chez un faible pourcentage de mélanomes (Elner et Elner, 1996). Les différences entre les résultats de ces études et la nôtre peuvent également provenir de la variabilité entre les donneurs, de la méthode utilisée, des anticorps utilisés ou encore de l'utilisation de tumeurs (Albelda et al., 1990; ten Berge et al., 1993; Elner et Elner, 1996; Elshaw et al., 2001) versus des lignées cancéreuses dans notre cas. Enfin, une études de Béliveau *et al.* a démontré en cytométrie de flux la présence, mais en quantité faible, de la sous-unité $\alpha 5$ à la surface des lignées cancéreuses TP31 et SP8.0 (Béliveau et al., 2000), ce qui est confirmé par nos résultats.

La lignée hépatique H79 dérivée d'une métastase hépatique du mélanome uvéal exprime toutes les sous-unités d'intégrines à l'étude. Le seul résultat qui diffère de la littérature est celui de la sous-unité $\beta 4$. En effet, une étude immunohistochimique effectuée sur des prélèvements tissulaires issus de métastases hépatiques du mélanome uvéal a démontré que les métastases étaient toutes positives pour les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$ et $\alpha v \beta 5$, 75% (3/4 tumeurs testées) pour les sous-unités $\alpha 4$ et $\alpha 6$, 50% (2/4 tumeurs testées) pour l'intégrine $\alpha v \beta 3$ et aucune lésion n'était positive pour la sous-unité $\beta 4$ (ten Berge et al., 1993). La différence entre ces résultats et notre étude peuvent provenir de la variabilité entre les donneurs, de la méthode utilisée, des anticorps utilisés ou encore de l'utilisation de tumeurs (ten Berge et al., 1993) versus des lignées cancéreuses dans notre cas.

Si nous comparons entre eux les profils d'expression des intégrines des quatre types de cellules présentés au tableau 3.1, la première chose que nous remarquons c'est que les sous-unités d'intégrines $\alpha 1$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ sont plus faiblement exprimées chez les MCN et les lignées cancéreuses de tumeurs primaires TP31 et SP8.0 comparativement à la lignée de métastase hépatique H79 (voir tableau 3.1). Une augmentation de l'expression de ces sous-unités pourrait faciliter l'implantation de la métastase au foie. Ainsi, il a été démontré que les intégrines $\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 5 \beta 1$ et $\alpha 6 \beta 4$ permettaient aux cellules tumorales une plus grande adhésion à la MEC du foie, dont la composition diffère des autres organes (Jiang, 1998). Cependant, la surexpression de la sous-unité $\alpha 5$, étant donné son rôle dans l'apoptose (Frisch et Ruoslahti, 1997), nous porte à croire qu'elle devrait en fait diminuer plutôt qu'augmenter les propriétés tumorigènes de la lignée hépatique. Nous n'avons par contre jamais évalué *in vivo* le potentiel de la lignée hépatique H79 à générer des tumeurs spécifiquement au foie. Elle ne présente peut-être aucun potentiel tumorigène. De plus, il ne faut pas oublier que les cellules de la métastase hépatique ont été remises en culture *in vitro* et que ça peut lui conférer des propriétés (et un patron d'expression des intégrines) totalement différent de chez la tumeur elle-même.

Ensuite, la sous-unité $\alpha 2$ est fortement exprimée dans les trois lignées cancéreuses, alors qu'elle est peu abondante chez les MCN (voir tableau 3.1). Cette sous-unité pourrait donc être impliquée dans le développement de la tumeur primaire. Les sous-unités d'intégrines $\alpha 3$, αv et $\beta 1$ sont exprimées fortement par les MCN et les trois lignées cancéreuses. Ces sous-unités ne seraient alors pas impliquées dans la progression du mélanome uvéal.

Un résultat intéressant est que la sous-unité $\alpha 4$ est exprimée seulement, mais faiblement, chez la lignée hépatique H79 (voir tableau 3.1). Ainsi, la lignée hépatique H79 exprimerait à nouveau cette sous-unité pour favoriser la colonisation du foie. Ces résultats diffèrent de ceux de la littérature. D'abord, Qian *et al.* (1994) ont démontré que l'expression de l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ est inversement corrélée avec les propriétés invasives d'un variant de la lignée murine B16, suggérant alors que la perte de $\alpha 4 \beta 1$, responsable de l'adhésion homotypique, pourrait être impliquée dans la capacité métastatique de certains types de mélanomes cutanés (Qian et al., 1994). Une seconde étude a aussi démontré une corrélation inverse entre l'expression du transcrit de l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ et le potentiel métastatique de la lignée cancéreuse SP6.5 dérivée d'une tumeur primaire du mélanome uvéal et de ses variants MH5 et MH10 (Larouche et al., 1998). Cependant, seul le transcrit de la sous-unité $\alpha 4$ a été étudié lors de cette étude; cela ne démontre pas nécessairement la présence de la protéine $\alpha 4$. Les résultats de la présente étude tendent plutôt vers l'hypothèse inverse selon laquelle la propagation tumorale serait proportionnelle à l'expression de la sous-unité $\alpha 4$, puisque la cellule normale (MCN) n'exprime pas cette sous-unité. Cela concorde avec des études immunohistochimiques effectuées sur des lignées de mélanomes uvéaux au stade primaire et leurs métastases, dont les résultats indiquent la présence de la sous-unité $\alpha 4$ chez un faible pourcentage de mélanomes, alors que l'expression de cette sous-unité augmente dans les métastases (pour une revue, voir Elner et Elner, 1996). Ce résultat pourrait être important, car la sous-unité $\alpha 4$ reconnaît le motif EILDV du site de liaison *connecting segment-1* (CS-1) de la fibronectine qui est sujet à un épissage alternatif (French-Constant, 1995). L'espace entre l'endothélium microvasculaire du foie et les hépatocytes contient d'ailleurs en abondance un variant d'épissage alternatif de la fibronectine, dans lequel on

retrouve le CS-1 (Martinez-Hernandez, 1984). Il est donc possible que l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ soit exprimée par la lignée H79 pour permettre sa migration et son adhérence au foie (Stroeken et al., 1998). L'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ est aussi le récepteur de VCAM qui est présent à la surface des cellules endothéliales vasculaires. Elle pourrait donc permettre le transport de la cellule cancéreuse à travers l'endothélium vasculaire (Taichman et al., 1991).

La sous-unité $\beta 3$ est également exprimée seulement chez la lignée hépatique H79, mais à un faible niveau (voir tableau 3.1). Cette sous-unité d'intégrine pourrait donc jouer un rôle dans l'apparition de métastases hépatiques. Une étude a d'ailleurs rapporté que l'intégrine $\alpha v \beta 3$ a une implication certaine dans la colonisation cancéreuse du foie (Yun et al., 1996). Cette étude a démontré que les cellules avec un fort potentiel métastatique ayant comme organe cible le foie, expriment en plus grande quantité cette intégrine comparativement aux cellules qui ont un potentiel métastatique peu développé.

La sous-unité $\beta 4$ n'est pas exprimée par les lignées cancéreuses TP31 et SP8.0 (voir tableau 3.1). La perte de l'expression de cette sous-unité pourrait jouer un rôle dans le développement de la tumeur primaire et de ses métastases, puisqu'elle est présente au départ chez la cellule normale, disparaît chez la tumeur primaire, puis réapparaît chez la métastase hépatique (voir tableau 3.1). Une forte expression de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$, qui est distribuée dans les cellules épithéliales et qui a pour ligand la laminine, serait associée avec un phénotype agressif et une capacité métastatique élevée (Falcioni et al., 1986).

Enfin, la sous-unité $\beta 5$ est fortement exprimée par les MCN, alors qu'elle est peu abondante chez les trois lignées cancéreuses du mélanome uvéal (voir tableau 3.1). La diminution de l'expression de cette sous-unité pourrait être impliquée dans le développement de la tumeur primaire et de ses métastases. Une surexpression de l'intégrine $\alpha v \beta 5$ à la surface des cellules hématopoïétiques a d'ailleurs été associée à une inhibition de la prolifération cellulaire et à l'apoptose (Yin et al., 2001).

En résumé, la lignée hépatique H79 exprime un plus grand nombre de sous-unités d'intégrines que les MCN et les lignées cancéreuses TP31 et SP8.0, alors que les MCN possèdent un plus grand nombre de sous-unités d'intégrines que les lignées cancéreuses TP31 et SP8.0. Plusieurs études ont d'ailleurs remarqué une différence dramatique dans l'expression et la distribution des intégrines à la surface des cellules cancéreuses métastatiques comparativement aux cellules de la tumeur primaire (pour une revue, voir (Hood et Cheresch, 2002)). Étant donné que les interactions cellule-MEC jouent un rôle important dans le développement d'une tumeur, dans l'invasion et la colonisation d'un autre organe, et que ces interactions sont médiées entre autre par les intégrines, l'hypothèse suivante pourrait être formulée : les cellules cancéreuses qui forment la tumeur et qui se détachent pour migrer vers un autre site exprimeraient moins d'intégrines à leur surface pour diminuer leur adhésion, alors que celles qui colonisent l'organe cible en exprimeraient un large spectre à leur surface. La transformation des mélanocytes en mélanome, puis en métastases, impliquerait d'abord une diminution de l'expression des intégrines lors du détachement des cellules de la tumeur primaire et de la migration cellulaire, suivi d'une augmentation de leur expression lors de l'implantation à l'organe cible (Humphries, 1993).

Les résultats de cytométrie de flux n'ayant pas permis de choisir la lignée cancéreuse la plus appropriée pour la banque de soustraction, nous nous sommes basés sur d'autres données pour faire notre choix parmi les lignées de tumeurs primaires du mélanome uvéal à notre disposition (SP6.5, SP8.0 et TP31). Ainsi, la plus grande agressivité de la lignée cancéreuse TP31 (décès du patient des suites des métastases 38 mois après l'énucléation) par rapport aux lignées cancéreuses SP6.5 (patiente en vie et aucune métastase diagnostiquée) et SP8.0 (décès du patient des suites des métastases 118 mois après l'énucléation), ainsi que l'absence de traitement par radiothérapie de la tumeur primaire à l'origine de la lignée cancéreuse TP31 comparativement à la lignée cancéreuse SP8.0, nous ont toutefois permis de sélectionner la lignée cancéreuse TP31 pour la construction de la banque de soustraction « tumeur primaire (lignée TP31) – MCN ».

3.2 IDENTIFICATION DE GÈNES EXPRIMÉS SPÉCIFIQUEMENT PAR LA LIGNÉE TP31 PROVENANT D'UNE TUMEUR PRIMAIRE DU MÉLANOME UVÉAL À L'AIDE D'UNE BANQUE DE SOUSTRACTION

À la suite de la caractérisation des MCN et des lignées cancéreuses du mélanome uvéal, l'identification de gènes exprimés spécifiquement par la lignée TP31 provenant d'une tumeur primaire du mélanome uvéal a été entreprise. Plusieurs étapes ont été nécessaires à l'obtention de clones spécifiques à la lignée TP31. D'abord, une banque de soustraction « tumeur primaire (lignée TP31) – MCN » a été construite dans le but d'isoler les transcrits spécifiques à la lignée TP31. Les transcrits obtenus ont ensuite été clonés pour créer une librairie de clones candidats. Ces clones ont alors été utilisés au sein d'un criblage différentiel, afin d'éliminer les faux positifs de la banque de soustraction avant d'effectuer le séquençage des clones. Une analyse bioinformatique des clones séquencés a permis par la suite de les classer en deux catégories (protéines connues ou inconnues) et de déterminer l'origine et le rôle des protéines connues. Enfin, la présence des clones intéressants (clones inconnus ou correspondant à des ESTs ou à des HTGS) dans d'autres tissus et lignées cancéreuses a été vérifiée par RT-PCR.

3.2.1 Banque de soustraction « tumeur primaire (lignée TP31) – MCN »

Afin d'isoler les transcrits spécifiques à la lignée TP31, une banque de soustraction « tumeur primaire (lignée TP31) – MCN » a été construite. Tout au long de la soustraction, des contrôles ont été nécessaires pour s'assurer de la réussite de chaque étape menant à l'identification de transcrits spécifiques à la tumeur primaire.

À la fin de l'extraction de l'ARN (section 2.3.1.1), un premier contrôle a été réalisé en effectuant une électrophorèse de l'ARN total des MCN et de la lignée TP31. La présence des deux bandes d'ARNr (18S et 28S) et l'intensité deux fois plus forte de la bande 28S par rapport à la 18S ont permis de confirmer la qualité de l'ARN total de ces deux types de cellules. Nous avons donc poursuivi la banque de soustraction en

transcrivant l'ARNm en ADNc. Suivant la synthèse du premier brin d'ADNc (section 2.3.1.2.1), un second contrôle a été effectué à l'aide d'une amplification PCR avec des amorces pour l'actine, afin de s'assurer de la transcription de l'ARNm en ADNc.

Un fragment d'actine de 600 pb a été amplifié chez les MCN et la lignée TP31, nous permettant de confirmer la transcription complète de l'ARNm en ADNc. Avant de poursuivre l'amplification de cet ADNc, il était primordial de déterminer le nombre optimum de cycles PCR, car l'ADNc amplifié par un trop grand nombre de cycles est un très mauvais matériel pour la soustraction, alors qu'un nombre insuffisant de cycles diminue la quantité de produit PCR obtenue. Afin de s'assurer de l'amplification exponentielle de l'ADNc, le nombre optimum de cycles PCR a été déterminé (section 2.3.1.2.2) par une amplification PCR de l'ADNc des MCN et de la lignée TP31 (voir figure 3.6).

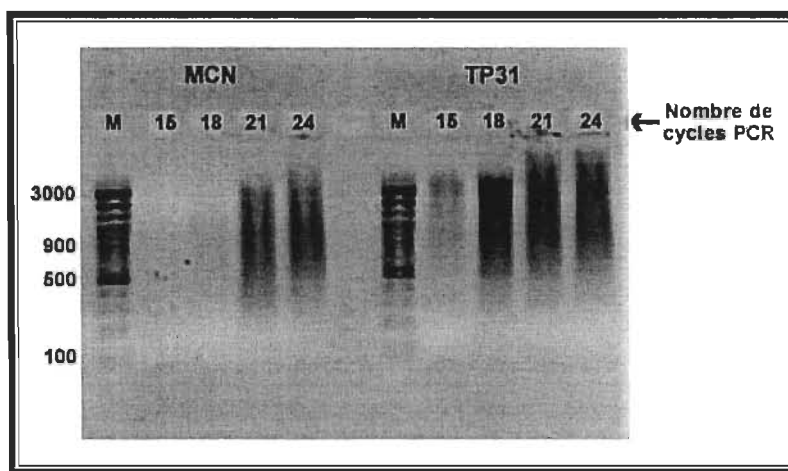


FIGURE 3.6 : Évaluation du nombre optimum de cycles PCR pour les MCN et la lignée TP31. Des échantillons ont été prélevés aux cycles 15, 18, 21 et 24. (M) marqueur.

Le résultat ressemble à celui de la compagnie *Clontech* (voir figure 7 de la page 8 du protocole PT3041-1). Étant donné que le nombre de cycles que nous allons utiliser pour amplifier l'ADNc devait être plus faible que celui nécessaire à l'atteinte d'un plateau, le nombre optimum de cycles pour les MCN a été fixé à 20, car le plateau était présent au 21^{ème} cycle, alors que pour la lignée TP31, le nombre optimum de cycles a été fixé à 17, puisque le plateau était atteint au 18^{ème} cycle. Après avoir déterminé le nombre

optimum de cycles PCR, les cycles additionnels nécessaires ont été réalisés pour tous les microtubes de *tester* et de *driver* de la section 2.3.1.2.2. Des échantillons de *tester* et de *driver* ont ensuite été analysés par électrophorèse pour valider le nombre optimum de cycles PCR que nous avons choisi (voir figure 3.7). Un PCR a également été effectué avec des amorces pour l'actine (section 2.3.1.2.2) pour vérifier l'intégrité de l'ADNc à cette étape (voir figure 3.7). La portion gauche de cette figure démontre que le nombre de cycles PCR que nous avons déterminé à l'étape précédente pour les MCN (20 cycles) et pour la lignée TP31 (20 cycles) ont permis une amplification exponentielle de l'ADNc.

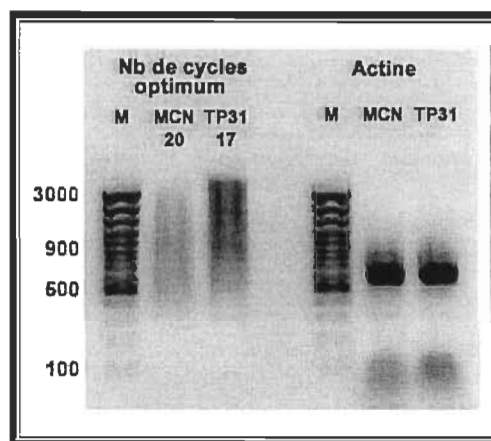


FIGURE 3.7 : Validation du nombre optimum de cycles PCR (20 et 17) et vérification de l'intégrité de l'ADNc pour les MCN et la lignée TP31. (M) marqueur.

La portion droite de cette figure montre l'amplification d'un fragment d'actine de 600 pb pour les deux types de cellules, nous assurant ainsi de la qualité de l'ADNc. L'ADNc amplifié a par la suite été purifié à l'aide d'une chromatographie sur colonne telle que décrite à la section 2.3.1.2.3 (voir figure 3.8). Le résultat est conforme à celui décrit par la compagnie *Clontech* (voir section 2.3.1.2.3). En comparant l'intensité des traînées des échantillons A (ADNc non purifié) et B (ADNc purifié, première fraction) de la figure 3.8, nous avons déterminé que le pourcentage de récupération du produit PCR après la chromatographie était inférieur à 30% pour les deux types de cellules. D'après l'intensité de l'échantillon C (ADNc purifié, deuxième fraction), cette fraction contenait une bonne quantité d'ADNc et donc un meilleur rendement que la première

fraction (échantillon B). Nous avons alors combiné les deux fractions avant de procéder à la digestion de cet ADNc avec l'enzyme de restriction *RsaI* telle que décrite à la section 2.3.1.2.4 (voir figure 3.9).

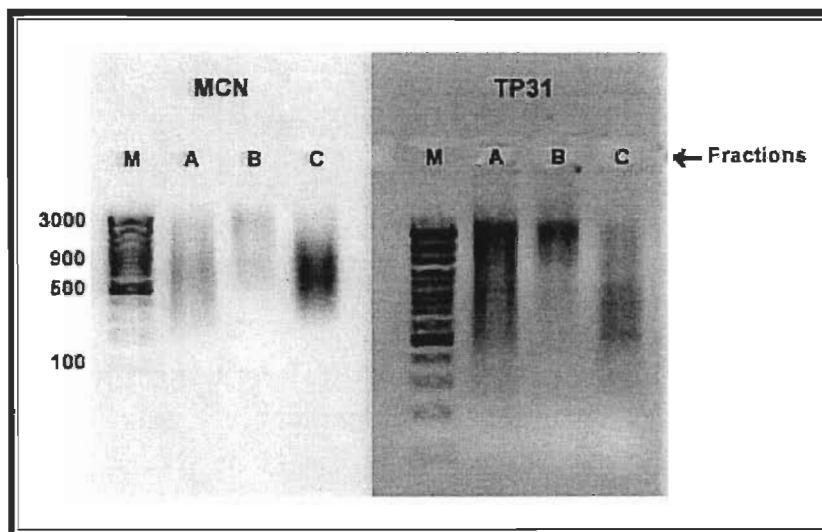


FIGURE 3.8 : Purification de l'ADNc amplifié des MCN et de la lignée TP31 par chromatographie sur colonne. (A) échantillon d'ADNc non purifié, (B) échantillon d'ADNc de la première fraction purifiée et (C) échantillon d'ADNc de la deuxième fraction purifiée. (M) marqueur.

À la suite de la digestion, cette figure montre qu'il y avait une diminution de la taille des fragments d'ADNc comparativement aux fragments d'ADNc non digérés qui ont migré à des poids moléculaires supérieurs. Ce résultat est conforme à celui décrit par la compagnie *Clontech* (voir figure 4 de la page 28 du protocole PT1117). Ainsi, avant la digestion, l'ADNc apparaissait sous forme d'une traînée qui s'étendait environ de 0,5 à 3 kb (*RsaI*-), tandis qu'après la digestion, la traînée s'étendait plutôt de 0,3 à 2 kb (*RsaI*+). Les courts fragments aux extrémités franches qui ont été produits lors de la digestion par l'enzyme de restriction *RsaI* vont permettre ainsi la liaison des adaptateurs de la banque de soustraction. L'ADNc digéré a ensuite été purifié (voir figure 3.10) et quantifié comme décrit à la section 2.3.1.2.5 avant de poursuivre la construction de la banque de soustraction.

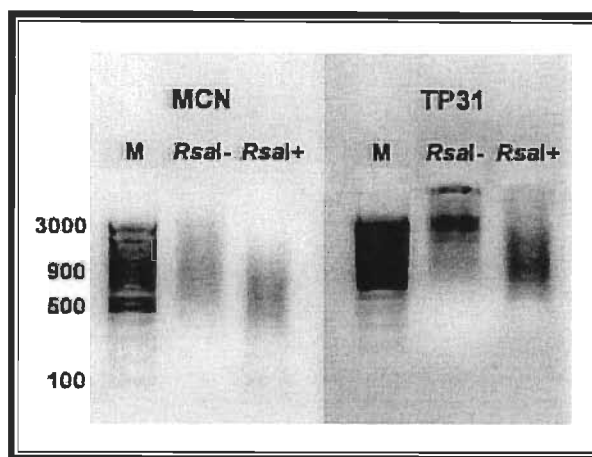


FIGURE 3.9 : Digestion de l'ADNc des MCN et de la lignée TP31 avec l'enzyme de restriction *RsaI*. On peut voir l'ADNc avant (*RsaI*-) et après la digestion (*RsaI*+). (M) marqueur.

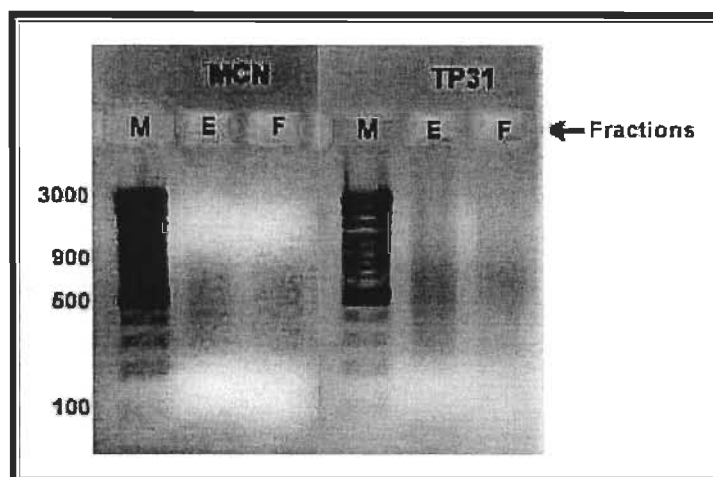


FIGURE 3.10 : Purification de l'ADNc digéré des MCN et de la lignée TP31. (E) échantillon d'ADNc digéré non purifié et (F) échantillon d'ADNc digéré purifié. (M) marqueur.

Le pourcentage de récupération de l'ADNc est évalué en comparant par électrophorèse l'intensité des échantillons avant (échantillon E) et après la purification (échantillon F). Le résultat est conforme à celui décrit par la compagnie *Clontech* (voir section 2.3.1.2.5). Pour les deux types de cellules, nous avons estimé à 70% la quantité d'ADNc qui a été récupérée à la suite de la purification.

La quantité d'ADNc contenue dans l'échantillon G (ADNc purifié et précipité) a également été estimée en comparant son intensité sur gel d'agarose avec celles de différentes concentrations connues du plasmide pSEAP2. En comparant chaque

échantillon G avec la bande de chaque concentration de plasmide, la concentration des MCN a été estimée à 0,6 µg/µl et celle de la lignée TP31 à 0,4 µg/µl. La quantité totale d'ADNc contenue dans les 5,5 µl restants (l'ADNc purifié et précipité a été dilué dans 6,7 µl; 1,2 µl ont été utilisés pour l'échantillon G) a été évaluée à 3,3 µg pour les MCN et à 2,2 µg pour la lignée TP31. Ces quantités étaient amplement suffisantes pour poursuivre la banque de soustraction, car l'ADNc des MCN et de la lignée TP31 devait être ajusté à une concentration de 0,3 µg/µl avant de débiter la ligation des adaptateurs comme décrite à la section 2.3.2.1.1. Afin d'effectuer plus tard un criblage différentiel des clones spécifiques à la lignée TP31, deux soustractions (directe : « lignée TP31 – MCN »; inverse : « MCN – lignée TP31 ») ont été réalisées.

D'abord, pour vérifier l'efficacité de la ligation des adaptateurs 1 et 2 dans les soustractions directe et inverse, des PCR avec des amorces pour l'actine et le *PCR Primer 1* ont été réalisés (voir figure 3.11). Les résultats ressemblent à ceux de la compagnie *Clontech* (voir figure 2.7 à la section 2.3.2.1.1). Ainsi, pour la soustraction directe, l'intensité des bandes des produits PCR amplifiés avec une amorce spécifique à un gène (amorce pour l'actine 3', puits #1 et 3, figure 3.11) et le *PCR Primer 1* était environ 25% plus faible que les bandes des produits PCR amplifiés avec les deux amorces spécifiques à un gène (amorces pour l'actine 3' et 5', puits #2 et 4, figure 3.11). Pour la soustraction inverse, l'intensité des bandes des produits PCR amplifiés avec une amorce spécifique à un gène (amorce pour l'actine 3', puits #5 et 7, figure 3.11) et avec le *PCR Primer 1* était environ 20% plus élevée pour le *tester 2-1* et 50% plus faible pour le *tester 2-2* que les bandes des produits PCR amplifiés avec les deux amorces spécifiques à un gène (amorces pour l'actine 3' et 5', puits #6 et 8, figure 3.11). Puisque l'intensité des bandes ne diffèrait pas de plus de quatre fois entre les produits PCR amplifiés avec les amorces actine 3'-*PCR Primer 1* et les produits PCR amplifiés avec les deux amorces pour l'actine, le rendement de la ligation était suffisant pour considérer la ligation comme étant efficace.

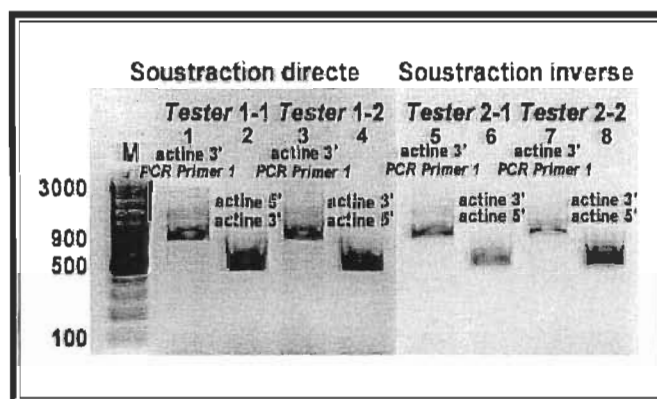


FIGURE 3.11 : Analyse de l'efficacité de la ligation des adaptateurs pour les soustractions directe et inverse. Un fragment de 750 pb a été amplifié avec l'amorce pour l'actine 3' et le *PCR Primer 1*. Un fragment de 600 pb a été amplifié avec les amorces pour l'actine 3' et 5'. Voir section 3.3.2.1.1 pour la signification de *Tester 1-1*, *Tester 1-2*, *Tester 2-1* et *Tester 2-2*. (M) marqueur.

Ensuite, deux hybridations et une première amplification PCR (section 2.3.2.4) ont été effectuées, puis une analyse de l'efficacité de la première amplification a été réalisée avec les produits des soustractions directe et inverse (voir figure 3.12).

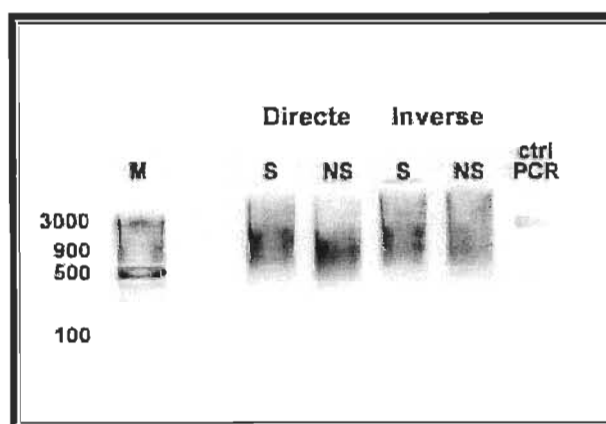


FIGURE 3.12 : Analyse de la première amplification PCR des soustractions directe et inverse. (S) produits PCR des soustractions, (NS) *Unabstracted tester controls* et (ctrl PCR) contrôle PCR d'ADNc soustrait. (M) marqueur.

Le résultat est conforme à celui décrit par la compagnie *Clontech* (voir section 2.3.2.4). Pour le contrôle PCR d'ADNc soustrait (fourni par la compagnie), deux bandes majeures correspondant à des fragments de ϕ X174/*Hae*III étaient visibles, ce qui a permis de s'assurer de l'activité de la polymérase utilisée. Par contre, les produits PCR

des soustractions et des *Unsubtracted tester controls* (S et NS, figure 3.12) apparaissaient sous la forme de traînées sans bande distincte, s'étendant de 0,5 à 3 kb.

Nous avons ensuite effectué la deuxième amplification PCR (section 2.3.2.5) et analysé son efficacité (voir figure 3.13). Le résultat ressemble à celui de la compagnie *Clontech* (voir figure 6 page 32 du protocole PT1117-1). Plusieurs bandes majeures correspondant à des fragments de ϕ X174/*Hae*III étaient visibles pour le contrôle PCR d'ADNc soustrait comparativement à deux bandes dans la première amplification (voir figure 3.12), indiquant ainsi l'efficacité de la deuxième amplification (voir figure 3.13). Les échantillons obtenus des soustractions (directe et inverse; S, figure 3.13) et les *Unsubtracted tester controls* (NS, figure 3.13) apparaissaient cependant, sous la forme de traînées sans bande distincte. Nous pouvons conclure que les deux amplifications PCR ont été efficaces, car il y avait une différence entre le patron des traînées des *Unsubtracted tester controls* (NS, figure 3.13) et celui des échantillons soustraits (S, figure 3.13). En effet, les sections des traînées plus foncées n'étaient pas situées à la même hauteur.

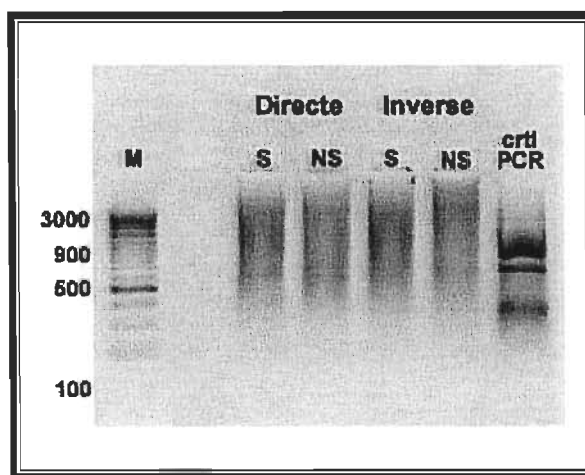


FIGURE 3.13 : Analyse de la deuxième amplification PCR des soustractions directe et inverse. (S) produits PCR des soustractions, (NS) *Unsubtracted tester controls* et (ctrl PCR) contrôle PCR d'ADNc soustrait. (M) marqueur.

Le dernier contrôle effectué concernait l'analyse de l'efficacité de la soustraction (section 2.3.2.5.1). Les résultats ressemblent à ceux de la compagnie *Clontech* (voir

figure 2.8 à la section 2.3.2.5.1). Un PCR avec des amorces pour l'actine a d'abord été réalisé avec le produit de la soustraction directe (voir figure 3.14).

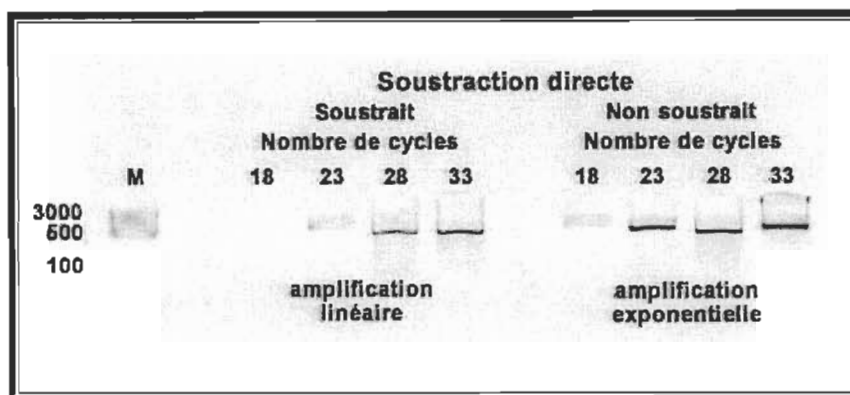


FIGURE 3.14 : Analyse de l'efficacité de la soustraction directe. Des échantillons ont été prélevés aux cycles 18, 23, 28 et 33. (M) marqueur.

Dans cette figure, le fragment de 600 pb de l'actine apparaissait après 18 cycles dans les échantillons d'ADNc non soustraits, mais seulement 5 cycles plus tard (23^{ème} cycle) dans les échantillons d'ADNc soustraits. Un PCR avec des amorces pour l'actine a également été réalisé avec le produit de la soustraction inverse (voir figure 3.15).

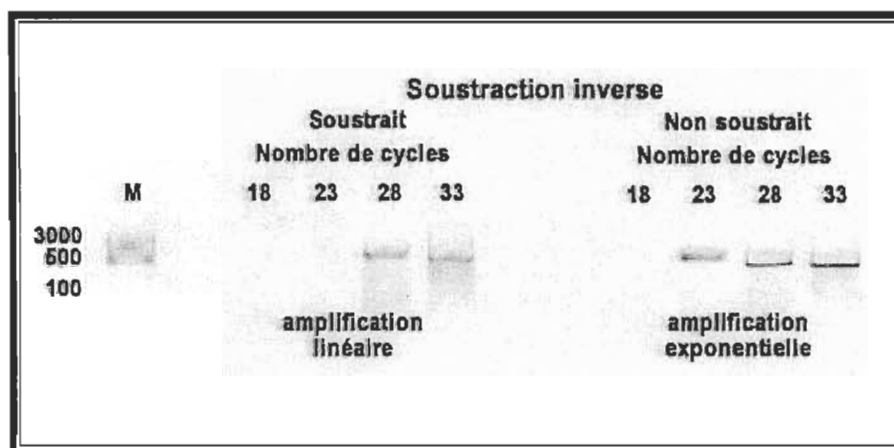


FIGURE 3.15 : Analyse de l'efficacité de la soustraction inverse. Des échantillons ont été prélevés aux cycles 18, 23, 28 et 33. (M) marqueur.

Dans cette figure, le fragment de 600 pb de l'actine apparaissait après 23 cycles dans les échantillons d'ADNc non soustraits, mais seulement au 28^{ème} cycle dans les échantillons d'ADNc soustraits. Le retard dans le nombre de cycles requis pour

l'amplification de l'actine dans les produits des deux soustractions est engendré par la présence d'adaptateurs à une seule extrémité de ce transcrit présent chez le *tester* et le *driver* (voir section 2.3.2, figure 2.8, molécules de type C). La présence des adaptateurs à une seule extrémité du transcrit d'actine crée ainsi une amplification linéaire lors des deux amplifications PCR de la banque de soustraction, car un seul des deux brins peut être amplifié par la polymérase, dans le sens $3' \Rightarrow 5'$, lors de chaque cycle PCR (voir figure 2.9 à la section 2.3.2). La quantité de transcrits d'actine est ainsi moins abondante dans les produits PCR à la fin des soustractions et l'actine est alors moins rapidement amplifiée dans ceux-ci. Quant aux échantillons non soustraits, l'actine y est amplifiée de façon exponentielle et le fragment de 600 pb apparaît donc à un nombre inférieur de cycles. Cette différence dans le nombre de cycles requis pour une amplification équivalente de l'actine dans les échantillons soustraits versus les non soustraits reflète l'efficacité de la soustraction. En effet, il doit y avoir une différence de 5 à 15 cycles entre ces deux types de préparations pour affirmer que la soustraction a été efficace, une différence de cinq cycles correspondant grossièrement à un enrichissement de l'ADNc par un facteur de vingt (comme documenté à la section 2.3.2.5.1, figure 2.13).

Suivant ces résultats, nous pouvons confirmer l'efficacité des deux soustractions, puisqu'il y avait une différence de cinq cycles dans le nombre de cycles requis pour une amplification équivalente de l'actine dans les échantillons soustraits versus les non soustraits.

3.2.2 Librairie de clones candidats spécifiques à la lignée TP31

Le clonage du produit PCR de la soustraction directe (« lignée TP31 – MCN ») dans le vecteur *pGEM-T Easy* a permis de créer une librairie de clones candidats qui étaient spécifiquement exprimés par la lignée TP31. Cette librairie a servi plus tard à éliminer les faux positifs présents dans la banque de soustraction à l'aide du criblage différentiel. À la suite de l'ensemencement de quatre géloses avec le produit PCR cloné de la soustraction directe, seules les colonies blanches ont été sélectionnées, puisqu'elles

devaient contenir un insert. Au total, 480 colonies ont été repiquées et amplifiées par PCR pour effectuer un criblage différentiel des clones candidats spécifiques à la lignée TP31.

3.2.3 Criblage différentiel de la librairie de clones candidats

L'amplification des inserts, la production de sondes radioactives à partir des produits PCR de la soustraction directe (« lignée TP31 – MCN »), de la soustraction inverse (« MCN – lignée TP31 ») et de l'ADNc de la lignée TP31 et des MCN, ainsi que l'hybridation de ces sondes avec des membranes contenant les clones candidats de la librairie a permis l'élimination des faux positifs présents dans la banque de soustraction directe (« lignée TP31 – MCN »). D'abord, les 480 colonies blanches ont été prélevées et amplifiées par PCR. Cette étape nous a permis de vérifier la présence d'un insert dans les vecteurs de chaque colonie, d'amplifier cet insert et de déterminer sa longueur (voir figures 3.16 à 3.20). Le résultat est conforme à celui décrit par la compagnie *Clontech* (voir figure 2.15 à la section 2.3.4.1). Parmi les colonies de la gélose 1 (voir figures 3.16 et 3.20), 75 contenaient des inserts, 37 n'en contenaient aucun et 8 colonies renfermaient plus d'un insert, ce qui donnait un rendement de clonage de 63%. Parmi les colonies de la gélose 2 (voir figures 3.17 et 3.20), 80 contenaient des inserts, 31 n'en contenaient aucun et 9 colonies renfermaient plus d'un insert, ce qui donnait un rendement de clonage de 67%. Parmi les colonies de la gélose 3 (voir figures 3.18 et 3.20), 81 contenaient des inserts, 27 n'en contenaient aucun et 12 colonies renfermaient plus d'un insert, ce qui donnait un rendement de clonage de 68%. Parmi les colonies de la gélose 4 (voir figures 3.19 et 3.20), 79 contenaient des inserts, 37 n'en contenaient aucun et 4 colonies renfermaient plus d'un insert, ce qui donnait un rendement de clonage de 66%. Parmi les derniers clones amplifiés, c'est-à-dire les clones 97 à 120 des gélases 1 à 4 (voir figure 3.20), très peu contenaient des inserts. Ce résultat pourrait provenir d'une sélection biaisée des colonies blanches due à la petite taille des dernières colonies prélevées, car il est plus difficile de distinguer la couleur de ces colonies. Les clones ont ainsi pu être classés en trois catégories : (1) les clones contenant un insert dont nous

pouvions déterminer la longueur (315/480 clones), (2) les clones ne contenant aucun insert (132/480 clones), et (3) les clones contenant plus d'un insert (33/480 clones). La majorité des inserts avaient des longueurs allant de 400 à 1000 pb.

Quatre sondes radioactives ont ensuite été produites à partir des produits PCR de la soustraction directe (« lignée TP31 – MCN »), de la soustraction inverse (« MCN – lignée TP31 »), d'ADNc de la lignée TP31 et d'ADNc de MCN. Chaque sonde a été dosée à l'aide d'un compteur à scintillations β et l'activité spécifique a été calculée pour obtenir une valeur de 5×10^7 cpm pour chaque sonde utilisée à l'étape d'hybridation avec les membranes. Chaque sonde a été hybridée avec quatre membranes contenant 96 clones et une membrane contenant 17 clones.

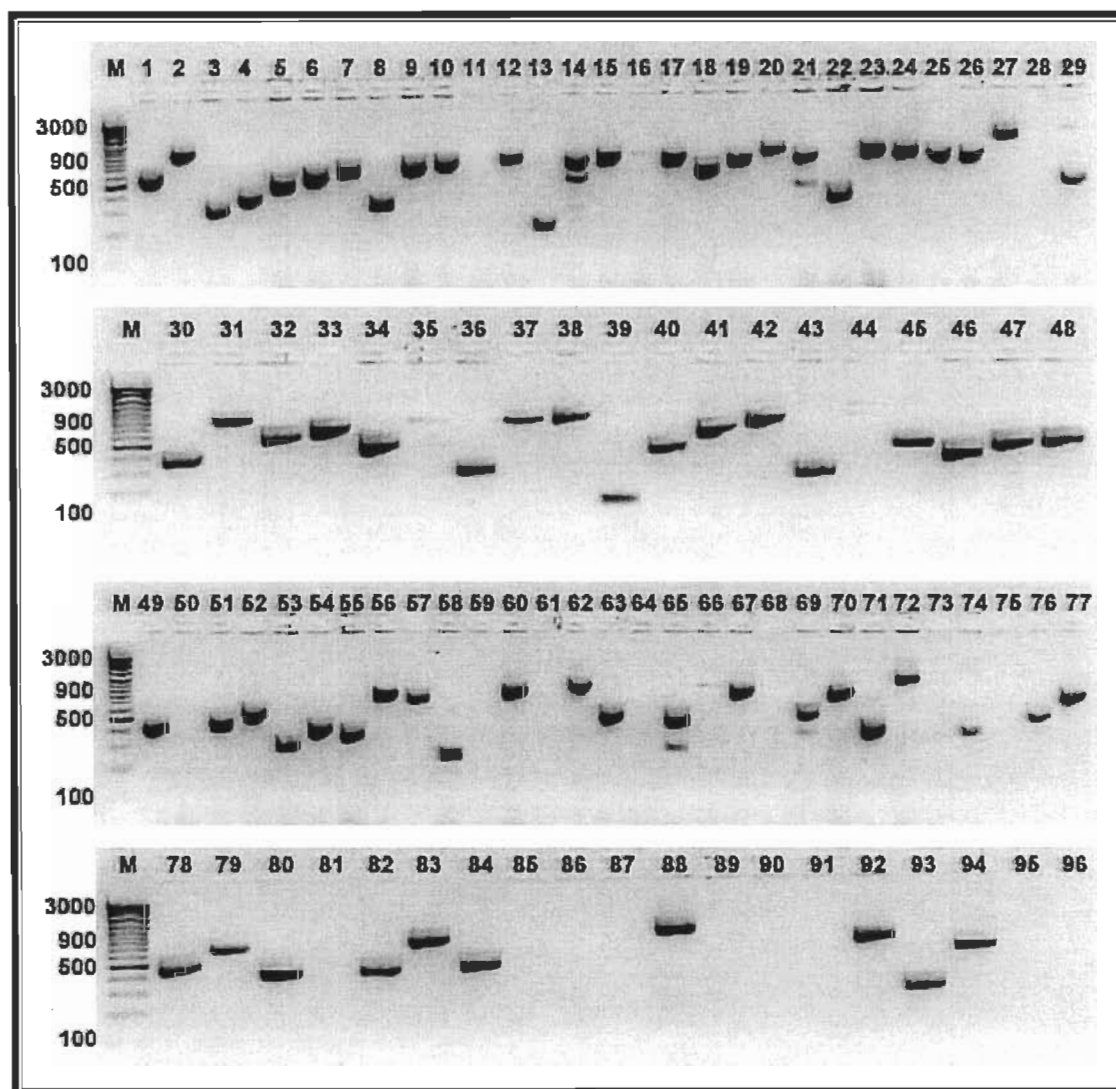


FIGURE 3.16 : Amplification des inserts des colonies 1 à 96 de la gélise 1. (M) marqueur.

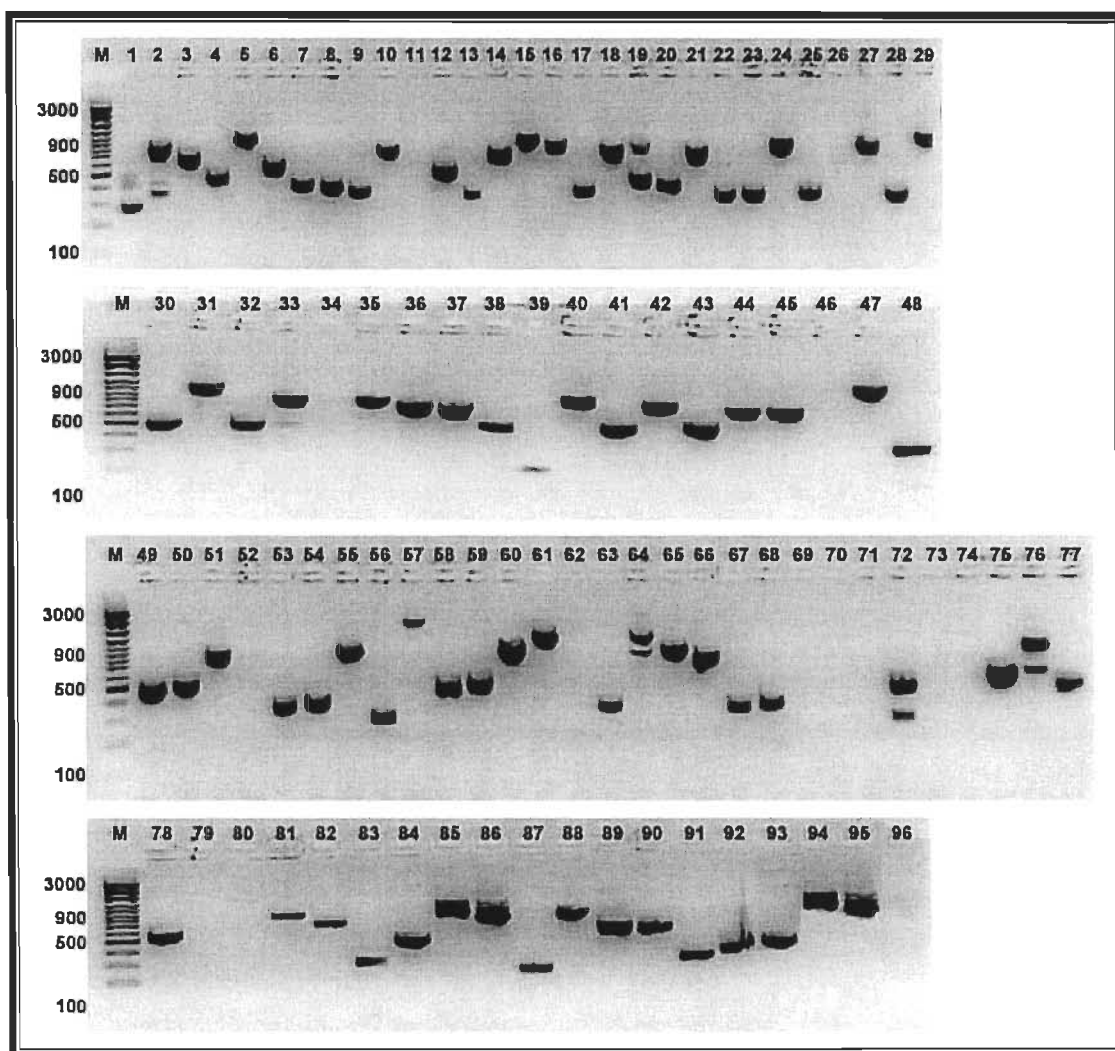


FIGURE 3.17 : Amplification des inserts des colonies 1 à 96 de la gélose
2. (M) marqueur.

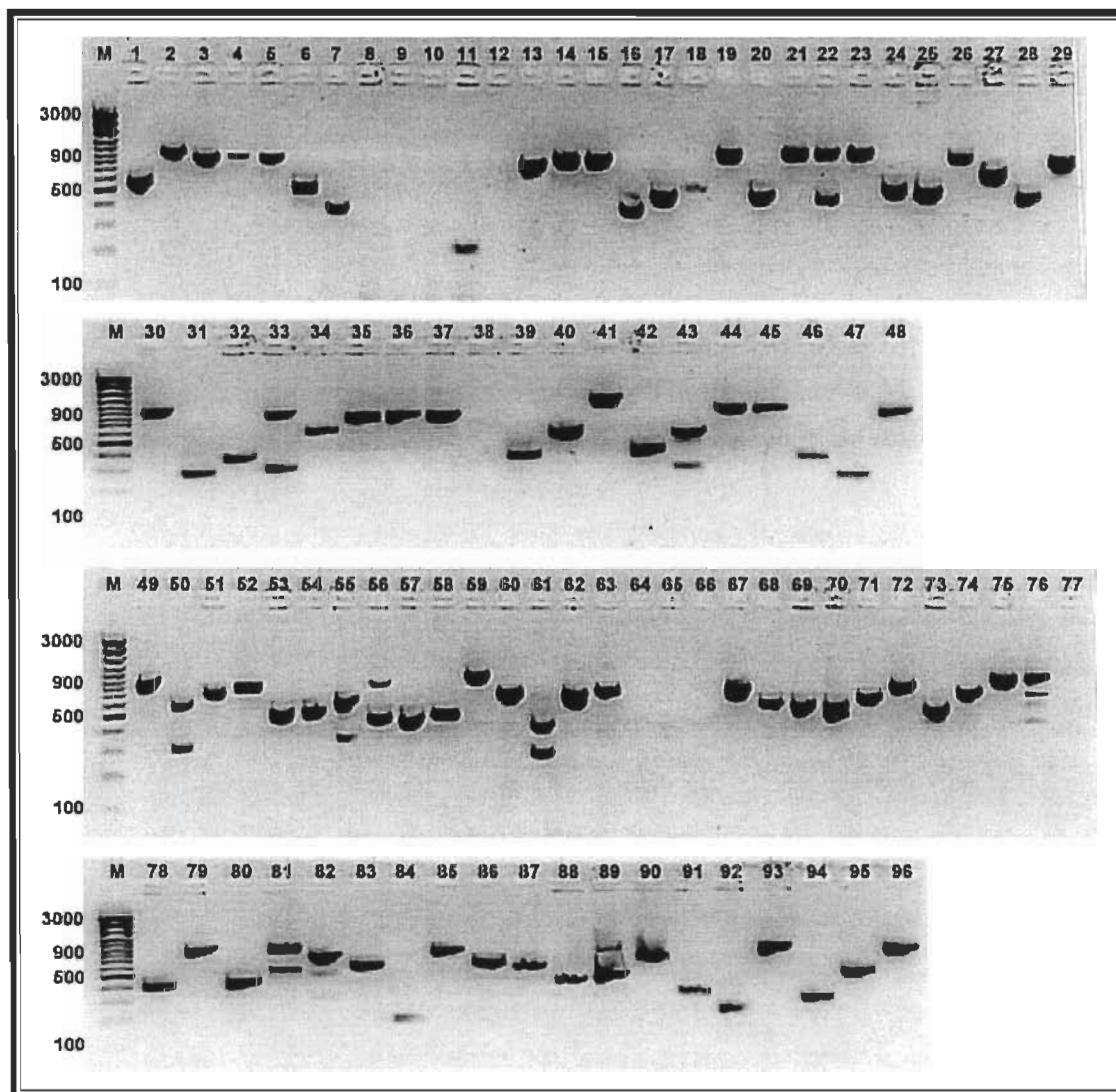


FIGURE 3.18 : Amplification des inserts des colonies 1 à 96 de la gélose 3. (M) marqueur.

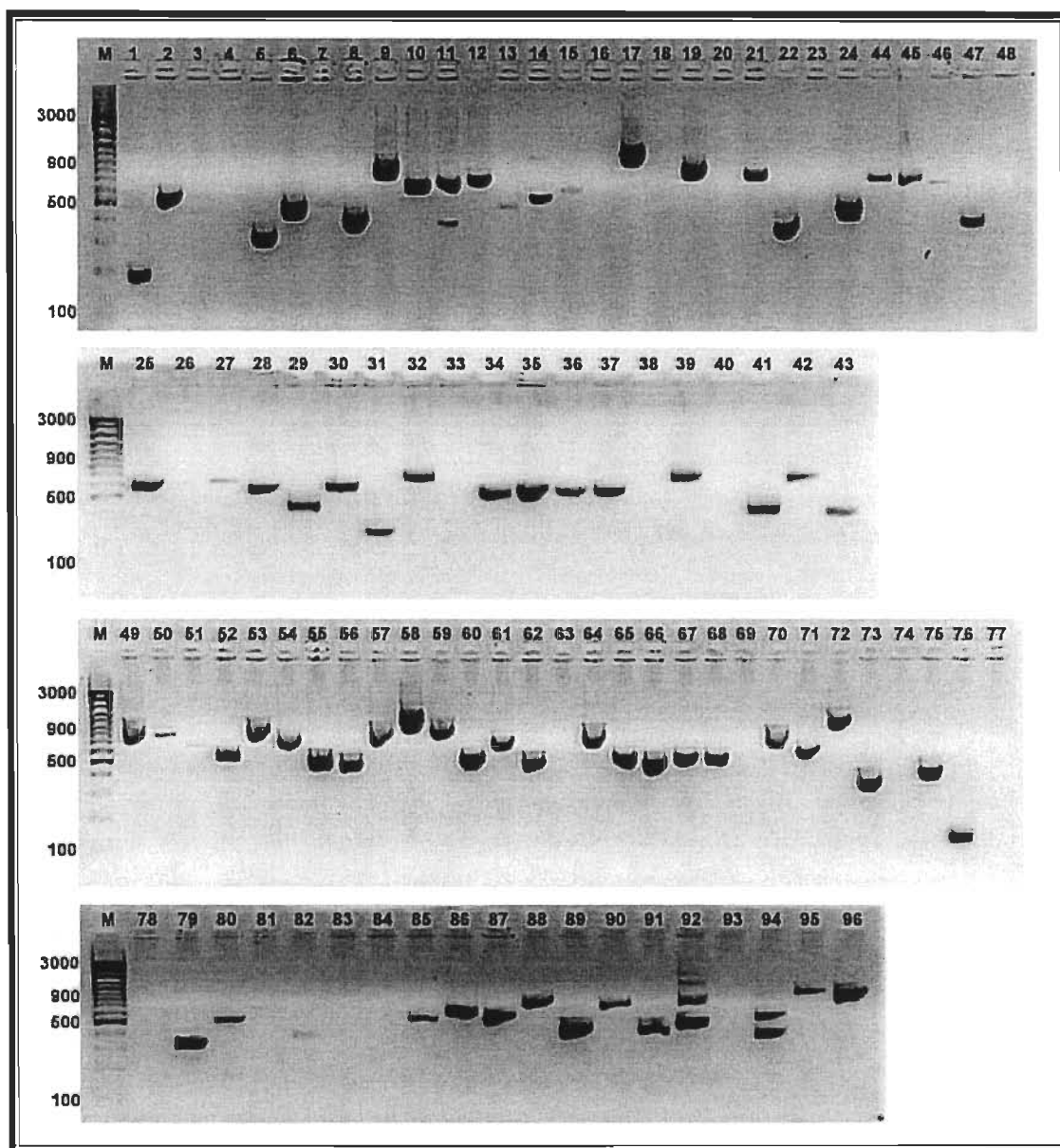


FIGURE 3.19 : Amplification des inserts des colonies 1 à 96 de la gélose 4. (M) marqueur.

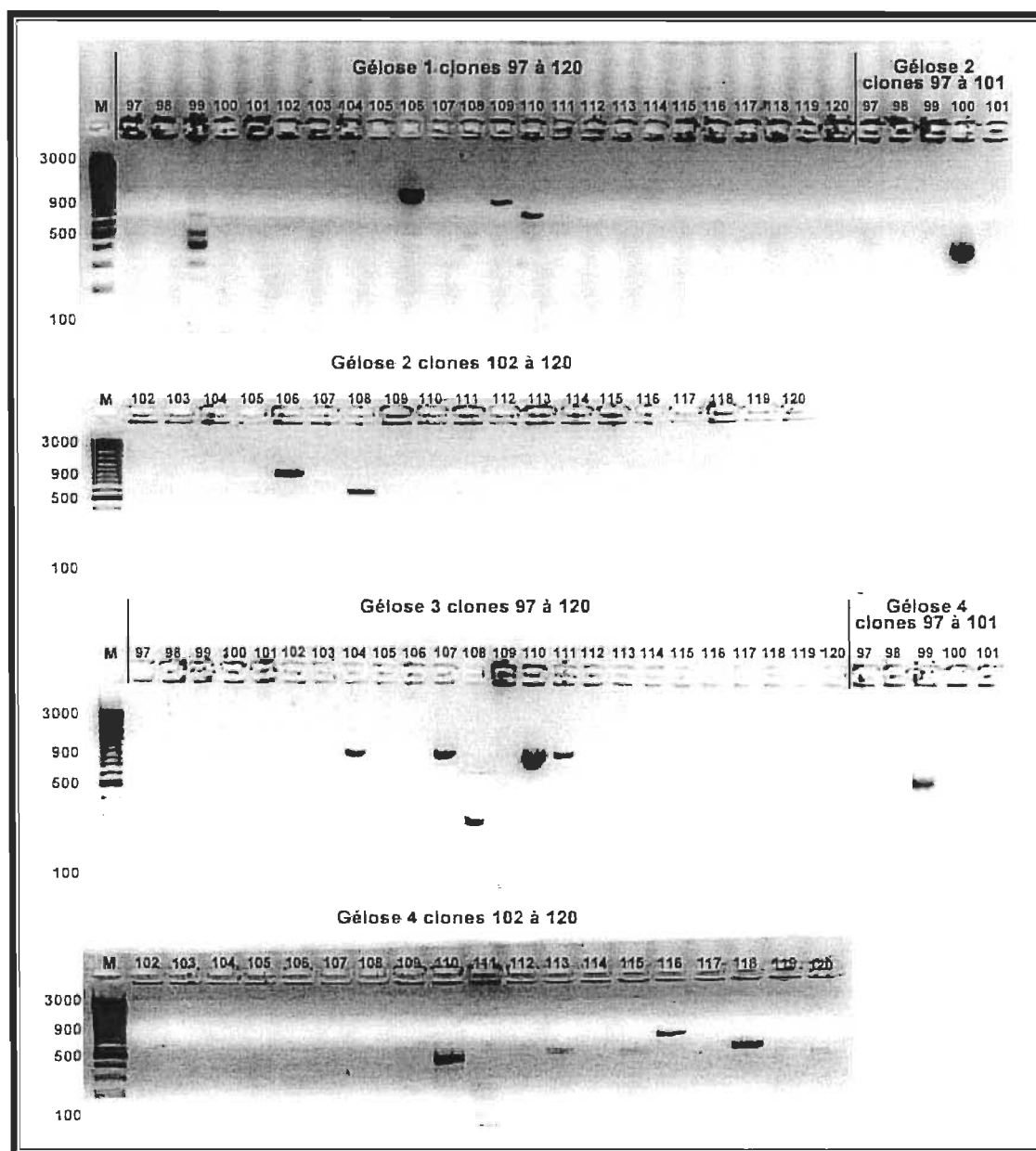


FIGURE 3.20 : Amplification des inserts des colonies 97 à 120 des gélases 1 à 4. (M) marqueur.

Bien que nous voulions analyser par criblage différentiel seulement les clones contenant un seul insert, les autres clones ont également été fixés sur des membranes (voir figures 3.21 à 3.24), sauf pour les clones 97 à 120 des quatre gélases où seuls les clones avec un insert ont été fixés sur la membrane (voir figure 3.25). L'interprétation des résultats du criblage différentiel a cependant été ajustée en conséquence (voir tableau 3.2), c'est-à-dire que seuls les résultats obtenus avec les clones contenant un seul insert sont présentés dans le tableau 3.2.

Les résultats des figures 3.21 à 3.25 ressemblent à ceux obtenus par la compagnie *Clontech* (voir figure 2.16 à la section 2.3.4.4). Le nombre de clones appartenant à chaque type de résultats de criblage différentiel (voir tableau 3.2) pour les cinq membranes a été déterminé pour les clones contenant un seul insert.

TABLEAU 3.2
Compilation des résultats du criblage différentiel

Soustraction directe	Sondes		ADNc de MCN	Nombre de clones
	ADNc de TP31	Soustraction inverse		
¹ +	+	–	–	102
+	–	–	–	28
+	+	–	+	50
² ++	+	+	+ ou – ⁴	40
+	+	+	+	79
³ –	–	–	–	16
Total				315

¹Hybridation de la sonde avec le clone

²Forte hybridation de la sonde avec le clone

³Aucune hybridation de la sonde avec le clone

⁴Hybridation ou aucune hybridation de la sonde avec le clone

La première catégorie de clones comprenait les transcrits spécifiques à la lignée TP31 (102 clones) qui ont été détectés par la sonde de la soustraction directe (+) et dont la quantité était suffisante avant l'amplification via la soustraction pour être détectée également par la sonde d'ADNc de TP31 (+) (ex. clone A1, figure 3.24). Ces clones sont absents lors de l'hybridation avec les sondes de la soustraction inverse (–) et de l'ADNc de MCN (–) (voir tableau 3.2).

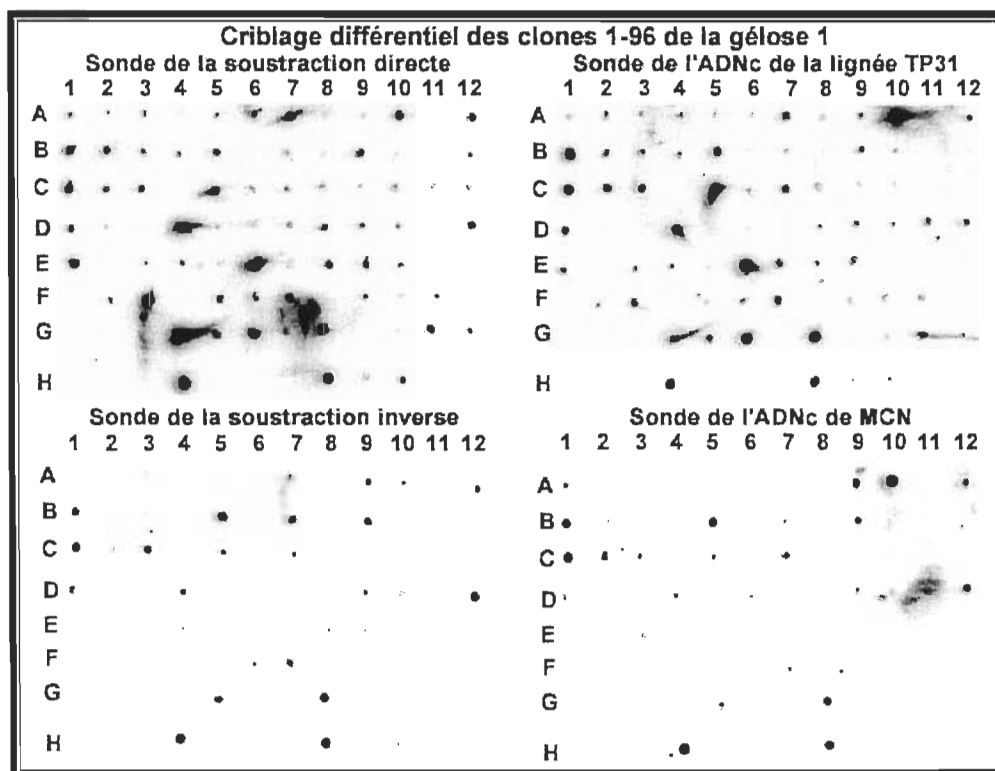


FIGURE 3.21 : Sélection des clones spécifiques à la lignée TP31 par criblage différentiel (gélase 1, clones 1-96).

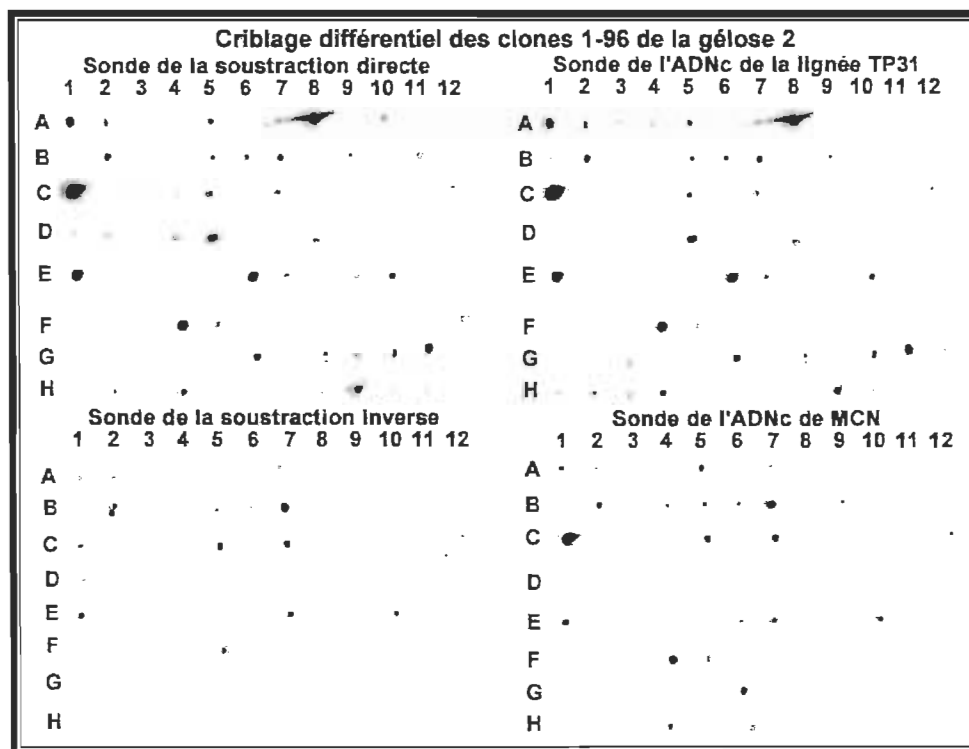


FIGURE 3.22 : Sélection des clones spécifiques à la lignée TP31 par criblage différentiel (gélose 2, clones 1-96).

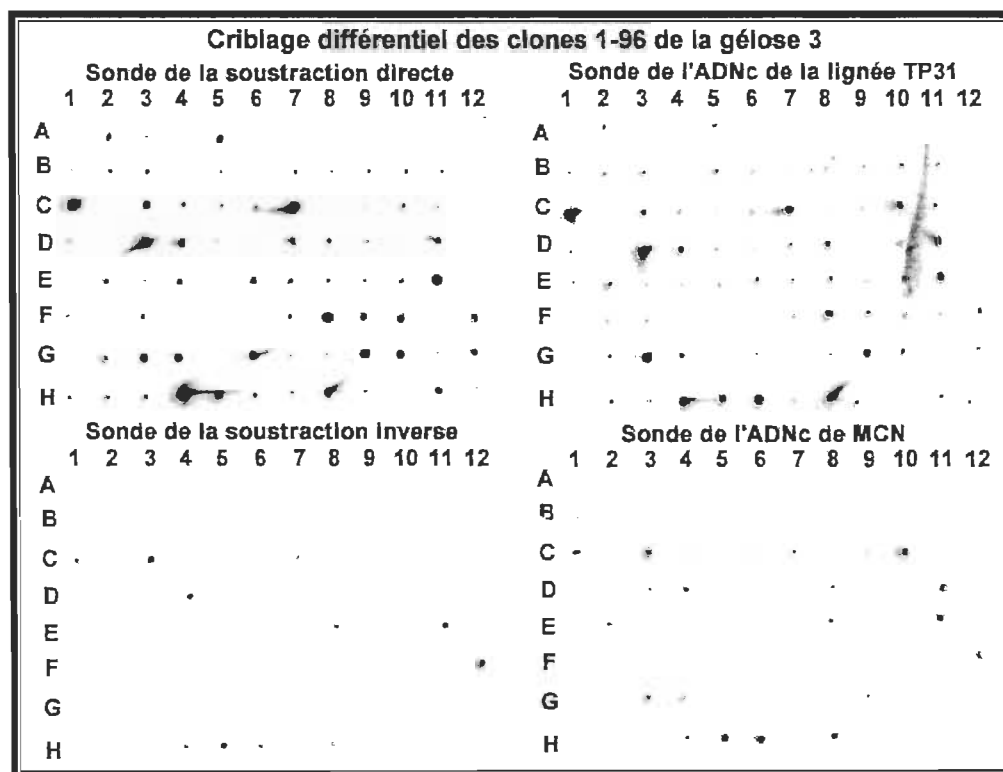


FIGURE 3.23 : Sélection des clones spécifiques à la lignée TP31 par criblage différentiel (gélose 3, clones 1-96).

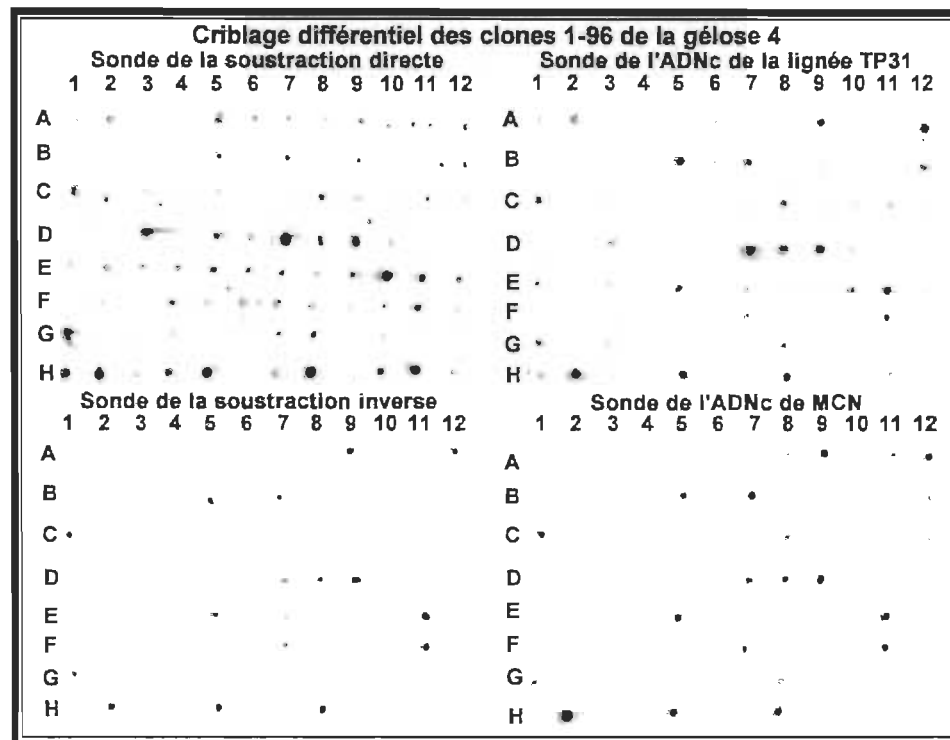


FIGURE 3.24 : Sélection des clones spécifiques à la lignée TP31 par criblage différentiel (gélose 4, clones 1-96).

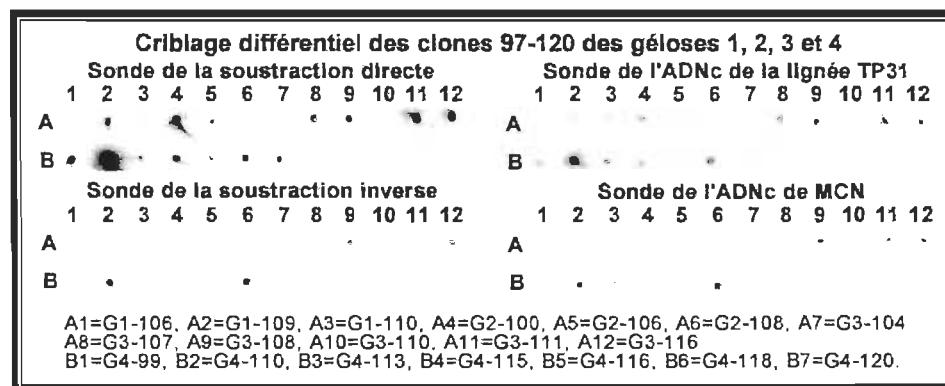


FIGURE 3.25 : Sélection des clones spécifiques à la lignée TP31 par criblage différentiel (gélises 1 à 4, clones 97-120). Les noms des 17/96 clones criblés sont inscrits sous les membranes.

La deuxième catégorie de clones renfermait des transcrits également spécifiques à la lignée TP31 (28 clones), mais qui correspondaient cette fois à des transcrits rares, en quantité insuffisante pour être détectés par la sonde d'ADNc de TP31, mais détectés avec la sonde de la soustraction directe à la suite de l'amplification via la soustraction (ex. clone F2, figure 3.24). La troisième catégorie de clones était plus difficile à interpréter. Des analyses en *Northern* montrent souvent que ces transcrits correspondent à des variants épissés ou encore possédant une mutation spécifique au *tester* (observations de la compagnie *Clontech*), qui est ici la lignée TP31 (50 clones) (ex. clone A5, figure 3.24). La quatrième catégorie de clones renfermait des transcrits qui pouvaient être soit surexprimés par la lignée TP31 (si l'intensité de signal était différente de plus de cinq fois entre les deux sondes des soustractions) ou non (si l'intensité de signal était différente de moins de trois fois entre les deux sondes des soustractions) (40 clones) (ex. clone G8, figure 3.24). Ensuite, la cinquième catégorie de clones contenait des transcrits non spécifiques à la lignée TP31 (79 clones) (ex. clone A9, figure 3.24). Ce nombre élevé de clones non spécifiques à la lignée TP31 aurait sûrement été inférieur si le facteur d'enrichissement de la banque de soustraction avait été supérieur à 20. Enfin, la dernière catégorie de clones renfermait des clones non spécifiques à la lignée TP31 (16 clones), mais présents en quantité insuffisante pour s'hybrider au clone correspondant chez les MCN (ex. clone D11, figure 3.24). Seuls les clones des deux premières catégories (total de 130) qui étaient spécifiques à la lignée TP31 ont ensuite été séquencés pour permettre leur analyse bioinformatique.

3.2.4 Analyse bioinformatique des clones spécifiques à la lignée TP31

Le séquençage des clones spécifiques à la lignée TP31 et leur analyse bioinformatique a permis (1) de déterminer l'identité et la localisation chromosomique des protéines connues qui sont codées par ces clones, ainsi que (2) de connaître la séquence et la localisation chromosomique des clones correspondant à des ESTs ou à des HTGS et enfin (3) de connaître la séquence partielle des clones inconnus (clones absents des banques de données).

À la suite du séquençage avec la première amorce (*Nested PCR Primer 1*), 112/130 clones ont pu être analysés à l'aide des différentes banques de données disponibles sur Internet (voir tableau 3.3). Les 18 autres clones devront être séquencés de nouveau avec la seconde amorce (*Nested PCR Primer 2*) car, lors du premier séquençage, les séquences obtenues étaient ambiguës, c'est-à-dire qu'elles comportaient beaucoup de N aux endroits où le séquenceur n'a pu déterminer la base (voir tableau 3.3).

Les clones dont le séquençage a permis de déterminer leur séquence ont ensuite été classés dans les quatre tableaux qui seront présentés dans les prochaines pages. Le tableau 3.4 contient les clones codant pour des protéines connues, mais dont la fonction, pour certaines, est inconnue. Le tableau 3.5 contient les clones correspondant à des ESTs ou à des HTGS. Les clones correspondant à des ESTs, mais retrouvés dans l'œil ou l'oreille, ont été ensuite regroupés dans le tableau 3.6. Finalement, les clones inconnus, c'est-à-dire introuvables dans les banques de données, ont été regroupés dans le tableau 3.7.

TABLEAU 3.3
Liste des clones envoyés au séquençage

État d'avancement du séquençage	Clones
Clones séquencés (112)	G1-4,G1-6,G1-8,G1-16,G1-30,G3-32,G1-33,G1-35,G1-36, G1-41,G1-43,G1-53,G1-54,G1-55,G1-58,G1-62,G1-70, G1-78,G1-79,G1-83,G1-84,G1-93,G1-109,G1-110,G2-3, G2-8,G2-10,G2-13,G2-15,G2-20,G2-22,G2-23,G2-24, G2-28,G2-32,G2-40,G2-41,G2-42,G2-43,G2-44,G2-45, G2-48,G2-50,G2-53,G2-59,G2-63,G2-66,G2-67,G2-68, G2-75,G2-77,G2-81,G2-82,G2-84,G2-89,G2-91,G2-92, G2-94,G2-100,G3-1,G3-3,G3-4,G3-5,G3-6,G3-7,G3-29, G3-36,G3-37,G3-41,G3-42,G3-46,G3-48,G3-49,G3-51, G3-53,G3-57,G3-60,G3-62,G3-68,G3-70,G3-71,G3-74, G3-78,G3-79,G3-80,G3-83,G3-84,G3-91,G3-93,G3-94, G3-96,G3-104,G4-1,G4-2,G4-21,G4-29,G4-31,G4-50, G4-52,G4-56,G4-60,G4-62,G4-65,G4-66,G4-68,G4-72, G4-75,G4-76,G4-91,G4-96,G4-116,G4-120.
Clones à séquencer de nouveau (18)	G1-20,G1-49,G1-82,G1-106,G2-34,G2-80,G2-108,G3-18, G3-24,G3-26,G3-52,G3-54,G4-7,G4-13,G4-15,G4-51, G4-95,G4-99.

Le tableau 3.4 contient la longueur du fragment, le nom de la protéine associée, le numéro d'accèsion au NCBI, la localisation chromosomique et la fonction pour 29 des 112 clones (25,9%) codant pour des protéines connues. Certains clones correspondaient au même transcrit; ils ont donc été regroupés.

TABLEAU 3.4
Clones codant pour des protéines connues

Clones	Nombre de pb	Protéine(s) associée(s)	# accession NCBI	LC ¹	Fonction(s)
G1-36	291	TIMM17A	NM_006335	1q32	importation de protéines immatures dans les mitochondries
G1-43	352	VRK1	NM_003384	14q32	régulation de la division cellulaire
G2-91	291				
G1-53	291	PPP3CA	NM_000944	4q24	régulation du Ca ²⁺ et de la calmoduline
G1-55	352	MIFT	AB006909	3p13	différenciation des mélanocytes
G2-68	380				
G1-58	252	GLNS	BX537384	1q31	détoxification (ammoniaque)
G1-83	700	TOP2A	NM_001067	17q21-q22	relaxation d'ADN superenroulé
G2-10	774	DKFZP434I1735	XM_113763	14q12	inconnue
G3-74	985				
G2-22	346				
		KCNB1	NM_004975	20q13.2	redresseur différé des canaux K ⁺
		MC3R	NM_019888		récepteur de la mélanocortine
G2-28	346	Anilline	NM_018685	7p14.2	implication dans la mitose
G3-78	400				
G2-100	411				
G4-52	570				
G2-32	473	ATP5JG	NM_006476	11q23	transport des ions H ⁺ dans les membranes mitochondriales
G2-43	400	MLH3	NM_014381	14q24.3	réparation des appariements d'ADN
G3-1	548				
G2-82	679	RAMP	NM_016448	1q32.3	régulation de l'acide rétinoïque
G2-84	435	PPARGC1	NM_013261	4p15.1	régulation de la biogenèse mitochon-

					driale
G3-46	391	ANP32E	NM_030920	1q21.3	inhibiteur de phosphatases et activateur de caspases
G3-68	748	MCFD2	NM_139279	2p21	transport de protéines du RE au Golgi
G3-93	942	Sous-unité d'intégrine $\alpha 6$	NM-000210	2q31.1	récepteur de la laminine
G3-96	900				
G3-94	300	GW128	AF107406	20q13.12	inconnue
G3-104	885	DC2	NM_021227	4q25	inconnue
G4-31	300	ch-TOG	NM_014756	11p11.2	organisation des fuseaux achromatiques
G4-60	541	Caluménine	NM_001219	7q32	maturation des protéines dans le RE
G4-65	570				

¹Localisation chromosomique

Nous pouvons d'abord remarquer que les protéines identifiées ne sont pas des protéines familières dont nous entendons régulièrement parler. Voyons brièvement la fonction des protéines énumérées dans le tableau précédent. Étant donné que la plupart des protéines mitochondriales sont encodées dans le noyau, puis traduites dans le cytosol, certaines protéines sont impliquées dans l'importation des protéines mitochondriales immatures, comme par exemple la *translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog A* (TIMM17A) qui est située dans la membrane mitochondriale interne (clone G1-36). Le gène de cette protéine se situe dans la région q32 du chromosome 1. À la suite du transport des pré-protéines du cytosol jusqu'à la membrane mitochondriale externe grâce aux translocases de la membrane mitochondriale externe, les protéines TIMM17A et TIMM23 forment un récepteur qui permet le transport des pré-protéines dans l'espace intermembranaire mitochondriale (Bauer et al., 1996). La présence de cette protéine dans la lignée TP31 pourrait s'expliquer par l'augmentation de l'activité métabolique lors de la transformation maligne du mélanocyte en cellule cancéreuse.

Ensuite, *vaccinia related kinase 1* (VRK1) est une protéine nucléaire fortement exprimée dans les cellules en très grande prolifération dont les cellules cancéreuses et embryonnaires (clones G1-43 et G2-91) (Nezu et al., 1997). Le gène qui code pour cette

protéine se situe dans la région q32 du chromosome 14. C'est une sérine/thréonine protéine kinase qui phosphoryle le résidu Thr18 du suppresseur de tumeur p53 régulant ainsi la division cellulaire et la réplication de l'ADN (Barcia et al., 2002). Parce que la rupture de la voie cellulaire de p53 peut permettre aux mutations de s'accumuler et ainsi de promouvoir une transformation maligne, il y a une forte tendance des tumeurs à inactiver cette protéine (Brantley et Harbour, 2000). La protéine p53 interagit d'ailleurs avec la protéine pRB dont l'expression aberrante a été associée avec plusieurs cancers dont le mélanome uvéal (Massaro-Giordano et al., 1999). Cependant, une étude a démontré que pRB et p53 sont rarement mutées dans le mélanome uvéal, mais que c'est plutôt d'autres acteurs de leur voie cellulaire respective qui seraient inactivés (Brantley et Harbour, 2000). Le rôle de p53, en réponse à un dommage génotoxique, est de stopper le cycle cellulaire en phase G1/S ou G2/M pour ainsi favoriser la réparation des dommages génétiques (Taylor et Stark, 2001). Pour jouer ce rôle, p53 doit se dissocier de son inhibiteur mdm2, un processus régulé par la phosphorylation. C'est VRK1 qui phosphoryle les molécules de p53, prévenant ainsi la liaison à leurs inhibiteurs (Ryan et al., 2001). Il est possible que la présence de VRK1 dans la lignée cancéreuse TP31 s'explique par les tentatives de la cellule à réparer les nombreuses mutations, tentatives infructueuses dans le cas de cette lignée, puisqu'il y a eu développement d'un mélanome.

Le gène de la protéine *protein phosphatase 3 (formerly 2B) catalytic subunit alpha isoform* (PPP3CA), qui est une protéine phosphatase régulatrice du complexe Ca^{2+} /calmoduline, se situe dans la région q24 du chromosome 4 (clone G1-53). Cette protéine est impliquée dans une voie physiologique coordonnant l'état phosphorylé des protéines et la concentration intracellulaire de Ca^{2+} (Seitz et al., 2002). L'équipe de Seitz a détecté cette protéine dans tous les tissus oculaires bovins (cornée, cristallin, iris, corps ciliaire, vitré, rétine, choroïde, sclère, nerf optique); ils ont alors postulé qu'elle aurait des implications dans l'immunorégulation, la transmission neuronale, la production d'humeur aqueuse et dans la toxicité oculaire des immunosuppresseurs. La PPP3CA est également impliquée dans la régulation de l'expression du ligand du récepteur Fas (FasL) (Anel et al., 1994). Il a déjà été prouvé que les cellules du mélanome uvéal

expriment le FasL à leur surface. La liaison des cellules du mélanome uvéal aux récepteurs Fas présents abondamment sur les hépatocytes induit l'apoptose de ces cellules hépatiques (Repp et al., 2001). Nous pouvons donc supposer que les cellules de la lignée TP31 pourraient favoriser l'expression de FasL à leur surface, via PPP3CA, pour ainsi faciliter leur migration au foie.

La protéine MIFT est un facteur de transcription dont le gène est situé dans la région p13 du chromosome 3 (clones G1-55 et G2-68). Il existe plusieurs isoformes de MIFT, dont MIFT-M qui est spécifique aux mélanocytes (Fuse et al., 1996; Amae et al., 1998; Fuse et al., 1999; Udonon et al., 2000; Takeda et al., 2002; Takemoto et al., 2002) et leur promoteur est régulé entre autres par le facteur de transcription *paired-box gene 3* (PAX3) (Watanabe et al., 1998). Une mutation de MIFT entraîne chez la souris une perte de la pigmentation des yeux, de l'oreille interne et de la peau, en plus de réduire la taille des yeux, et d'entraîner une surdité précoce (Yoshitake et al., 1999). Étant donné qu'une mutation de ce gène entraîne une absence de mélanocytes dans les tissus affectés, l'équipe de Tachibana a spéculé que la protéine MIFT serait impliquée dans la médiation de la différenciation des mélanocytes (Tachibana et al., 1996). Il a d'ailleurs été démontré que MIFT active le gène de la tyrosinase, une enzyme clé de la mélanogenèse (Selzer et al., 2002). La protéine MIFT est impliquée dans le syndrome de Waardenburg type IIA (locus 3p14.1-p12.3), une maladie qui entraîne des anomalies visuelles (tractus uvéal) et auditives (cochlée) (Tassabehji et al., 1994; Tachibana et al., 1996). Une étude de Mouriaux *et al.* (2003) a démontré, à l'aide d'un anticorps reconnaissant l'extrémité C-terminale de MIFT (qui reconnaît ainsi toutes les isoformes), que les MCN n'expriment pas cette protéine, comparativement aux lignées ou tumeurs du mélanome uvéal. Dans cette même étude, les isoformes exprimées par le mélanome uvéal ont été identifiées par amplification PCR; il s'agit des isoformes MIFT-A et MIFT-M (Mouriaux et al., 2003). La famille des facteurs de transcription MIFT étant largement exprimée dans les cellules malignes d'origine mélanocytaire, c'est une expression différentielle des isoformes de MIFT qui influencerait le phénotype, la croissance et la transformation maligne (Selzer et al., 2002; Mouriaux et al., 2003). L'expression de MIFT représentant un bon indicateur de l'engagement d'une cellule dans la voie

mélanocytaire, l'absence de cette protéine chez les MCN pourrait s'expliquer par leur état différencié (Mouriaux et al., 2003). D'après les résultats que nous avons obtenus, une isoforme de MIFT était présente chez notre tumeur primaire, mais il faudrait vérifier laquelle, en amplifiant par PCR la région N-terminale (exon 1) spécifique à chaque isoforme.

La glutamine synthétase (GLNS) est exprimée dans tout le corps et joue un rôle important dans le contrôle du pH corporel en retirant l'ammoniaque de la circulation sanguine (clone G1-58). Le gène codant pour cette protéine se trouve dans la région q31 du chromosome 1 (Pesole et al., 1991). Cette protéine sert également de marqueur pour la détection de lignées hépatocellulaires au stade prénéoplasique ou néoplasique précoce (Gebhardt et Williams, 1995). L'expression de cette protéine par les cellules de la lignée TP31 pourrait avoir été stimulée par une augmentation du taux d'ammoniaque dans leur environnement.

La *topoisomerase (DNA) II alpha* (TOP2A), dont le gène est situé dans la région q21-q22 du chromosome 17, est une enzyme qui contrôle et altère les états topologiques de l'ADN (clone G1-83). La TOP2A catalyse la relaxation des molécules d'ADN superenroulées, la condensation des chromosomes et la séparation des chromatides, des processus qui ont lieu durant la transcription et la réplication de l'ADN (Miller et al., 1981). L'expression de cette protéine est augmentée dans plusieurs cancers dont le carcinome embryonnaire (Berney et al., 2002) et le cancer du colon (Lazaris et al., 2002). De plus, l'expression du gène de la TOP2A est régulée par le suppresseur de tumeur p53 dans le carcinome pulmonaire (Liu et al., 2002). La TOP2A induirait également une résistance aux drogues chez les tumeurs qui expriment beaucoup de cette enzyme (Chikamori et al., 2003). La présence en grande quantité de cette enzyme chez la lignée TP31 aurait pu favoriser la résistance de cette tumeur aux différentes chimiothérapies et c'est souvent le cas dans le mélanome uvéal (Woll et al., 1999).

Le clone G2-22 contenait deux transcrits. dont les gènes sont retrouvés dans la région q13.2 du chromosome 20. D'abord, un bout du transcrit correspondait à la

protéine *shab-related potassium voltage-gated channel 1* (KCNB1), un redresseur différé des canaux K^+ , qui est activé lentement après la dépolarisation membranaire et est désactivé après seulement quelques secondes (Mazzanti et al., 1996). Ensuite, la seconde partie du transcrit correspondait au *melanocortin 3 receptor* (MC3R), qui reconnaît le cœur de la séquence heptapeptidique des mélanocortines. Les mélanocortines sont des hormones aux diverses actions physiologiques, dont la régulation de la pigmentation des mélanocytes (De Wied et Jolles, 1982), la thermorégulation (Feng et al., 1987), l'entreposage des graisses corporelles (Fan et al., 1997), le contrôle du système cardiovasculaire (Li et al., 1996), l'apprentissage et la mémoire (De Wied et Croiset, 1991) et elles produiraient également des effets immunomodulateurs (Smith et al., 1992). Les mélanocortines médient leurs effets via leurs récepteurs couplés à des protéines G (MCR1 à MCR5) qui vont stimuler l'adénylate cyclase (Mountjoy et al., 1992). Le récepteur MCR3 n'est pas exprimé dans la lignée A375 dérivée d'un mélanome cutané (Gantz et al., 1993). Nos résultats avec la lignée TP31 dérivée d'un mélanome uvéal sont différents, puisque MCR3 était exprimé dans cette lignée. Plusieurs études récentes ont révélé de très grandes différences cytogénétiques et moléculaires entre les mélanomes cutané et uvéal. La présence de MCR3 au sein du mélanome uvéal comparativement au mélanome cutané pourrait constituer une autre de ces différences.

L'anilline est une protéine impliquée dans la mitose, dont le gène est situé dans la région p14.2 du chromosome 7 (clones G2-28, G3-78, G2-100 et G4-52). Elle fonctionne en association avec les septines, l'actine et la myosine II durant la formation du sillon de division, une invagination de la surface cellulaire dans la région centrale de la cellule. Durant la télophase, un sillon de division se forme et un anneau contractile de microfilaments commence à se contracter. Le sillon de division devient de plus en plus profond jusqu'à ce que deux nouvelles cellules complètes soient séparées. L'anilline jouerait plus précisément un rôle dans l'organisation des câbles d'actine durant la formation du sillon de division et elle médierait les interactions entre l'actine et les septines/cytosquelette membranaire (Oegema et al., 2000). La présence de cette protéine

au sein de la lignée TP31 démontre encore une fois le haut niveau de prolifération de ces cellules cancéreuses.

La protéine *ATP synthase, H⁺ transporting mitochondrial F₀ complex subunit g* (ATP5JG), dont le gène est situé dans la région q23 du chromosome 11, est impliquée dans le transport des protons à travers les membranes mitochondriales (clone G2-32) (Millan et al., 2003). La présence de cette protéine dans la lignée TP31 pourrait s'expliquer par une augmentation de l'activité métabolique lors de la transformation maligne du mélanocyte en cellule cancéreuse.

La protéine *mutL E. coli homolog 3* (MLH3), dont le gène est retrouvé dans la région q24.3 du chromosome 14, est impliquée dans la correction des erreurs chromosomiques associées à la réplication et à la recombinaison de l'ADN (clones G2-43 et G3-1). Un dysfonctionnement du système de réparation des mauvais appariements donne lieu à un phénotype mutateur qui se manifeste par une instabilité des microsatellites, comme dans le cas du cancer colorectal (Wu et al., 2001). Étant donné l'allure du caryotype de la lignée TP31 (voir figure 3.29), qui contient plusieurs anomalies chromosomiques, il n'est pas étonnant de retrouver cette protéine réparatrice de l'ADN au sein de notre banque de soustraction. L'accumulation de changements génétiques comme, par exemple, des anomalies chromosomiques structurales, est souvent associée avec une augmentation du potentiel de malignité des cellules cancéreuses (Lauffart et al., 2002).

La *retinoic acid-regulated nuclear matrix-associated protein* (RAMP) joue un rôle dans la régulation de l'acide rétinoïque et son gène est situé dans la région q32.3 du chromosome 1 (clone G2-82). C'est une protéine riche en résidus sérine et thréonine qui est associée aux protéines de la matrice nucléaire et qui est exportée du noyau au cytoplasme lors de la mitose et de la cytokinèse. Elle jouerait un rôle dans la prolifération cellulaire de certaines cellules cancéreuses dont celles du carcinome embryonnaire (Cheung et al., 2001). Dans les cellules en division active, une plus grande expression de RAMP est observée dans le cytoplasme. Il existe également une forte

association entre RAMP et le développement embryonnaire, association démontrée par la grande expression de cette protéine dans les tissus fœtaux contrairement aux tissus adultes (Cheung et al., 2001). La présence de cette protéine au sein de la lignée TP31 démontre encore une fois le haut niveau de prolifération de ces cellules cancéreuses.

Le coactivateur du récepteur nucléaire PPAR γ , le *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, coactivator 1* (PPARGC1), dont le gène se situe dans la région p15.1 du chromosome 4, joue un rôle entre autres dans la biogenèse mitochondriale et la prolifération cellulaire (clone G2-84) (Knutti et Kralli, 2001; Scarpulla, 2002). La présence de cette protéine dans la lignée TP31 pourrait s'expliquer par une augmentation de l'activité métabolique lors de la transformation maligne et de la prolifération de ces cellules cancéreuses.

La protéine *acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 member E* (ANP32E), dont le gène est retrouvé dans la région q21.3 du chromosome 1, exerce diverses fonctions dont la suppression de tumeur et le transport des protéines liant l'ARN (clone G3-46) (Chen et al., 1996; Kadkol et al., 1999; Bai et al., 2001; Kadkol et al., 2001). Il a également été démontré que ANP32E joue un rôle dans la localisation de l'appareil de Golgi via une liaison aux *microtubule associated proteins* (MAP) (Ulitzur et al., 1997a, b). Son association avec les MAPs suggère donc que cette protéine est impliquée dans le maintien de la morphologie, la régulation du mouvement des mitochondries, lysosomes, peroxysomes et vésicules, en plus d'aider au maintien de l'intégrité du RE (Drubin et Nelson, 1996; Goodson et al., 1997). La présence de cette protéine dans la lignée TP31 pourrait provenir d'une augmentation de l'activité métabolique et donc de la transcription lors de la transformation maligne.

La *multiple coagulation factor deficiency protein* (MCFD2), dont le gène est situé dans la région p21 du chromosome 2, est retrouvée dans le compartiment intermédiaire RE-Golgi (clone G3-68). En se complexant avec la protéine *mannose-binding lectin-1* (LMAN1), cette protéine permet le transport des protéines du RE au Golgi (Zhang et al., 2003). La présence de cette protéine dans la lignée TP31 pourrait provenir d'une

augmentation de l'activité métabolique et de la synthèse protéique lors de la prolifération maligne.

La sous-unité d'intégrine $\alpha 6$, dont le gène se trouve dans la région q31.1 du chromosome 2, s'associe avec les sous-unités $\beta 1$ ou $\beta 4$ pour former des récepteurs qui lient le bras long de la laminine (clones G3-93 et G3-96). L'intégrine $\alpha 6\beta 4$, exprimée de façon prédominante dans les cellules épithéliales (Tamura et al., 1990), est associée, lorsque présente à des niveaux élevés, avec le phénotype agressif et la capacité métastatique de certaines cellules cancéreuses (Falcioni et al., 1986). Une étude de Sager *et al.* (1993) suggère plutôt que la sous-unité $\alpha 6$ serait un gène suppresseur de tumeur. Ainsi, l'expression de ce gène, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine, est réduite dans les lignées de carcinomes mammaires primaires et elle est complètement perdue dans les lignées de métastases de carcinomes mammaires (Sager et al., 1993). Une étude immunohistochimique de D'Ardenne *et al.* (1991), effectuée sur des tissus mammaires normaux et des carcinomes mammaires, a démontré une diminution ou une disparition du marquage de l'anticorps anti- $\alpha 6$ au niveau de la membrane basale. Cependant, le marquage cytoplasmique détecté dans les tissus mammaires normaux était conservé dans les carcinomes mammaires (D'Ardenne et al., 1991), ce qui concorde avec les résultats de Sager *et al.* (1993). Si nous comparons ce résultat de la banque de soustraction avec ceux de la cytométrie de flux, il y a certaines contradictions (voir figures 3.2 et 3.3). Les données en cytométrie de flux suggèrent que la sous-unité $\alpha 6$ est exprimée par la lignée TP31 et les MCN. Cependant, les résultats de la banque de soustraction suggèrent qu'elle devrait être détectée seulement chez la lignée TP31. Ensuite, la sous-unité $\beta 4$ est également exprimée par les MCN. Cette sous-unité s'associant seulement avec la sous-unité $\alpha 6$, nous devrions donc détecter la sous-unité $\alpha 6$ à la surface des MCN lors de la cytométrie de flux, ce qui est le cas (voir figure 3.2). Les résultats de cytométrie de flux avec la lignée TP31 démontrent qu'elle exprime la sous-unité $\alpha 6$, mais pas la sous-unité $\beta 4$. Nous pouvons donc supposer que ce serait l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ qui lierait la laminine chez la lignée TP31 et non $\alpha 6\beta 4$. Pour clarifier cette énigme, nous avons effectué une amplification PCR de la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ chez les MCN et les lignées SP6.5 et TP31 (voir figure 3.26). Le résultat obtenu à l'aide de l'amplification PCR permet de

confirmer celui de la banque de soustraction, puisqu'un fragment de 210 pb est détecté seulement chez les lignées TP31 et SP6.5. Pour valider le résultat négatif des MCN, une amplification PCR avec l'actine a été effectuée en parallèle et un fragment de 600 pb a été amplifié dans les trois types de cellules. Des études immunohistochimiques effectuées sur des lamelles de mélanocytes uvéaux normaux en culture avaient d'ailleurs démontré qu'ils n'exprimaient pas l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ (Elshaw et al., 2001). Comment expliquer alors les résultats de cytométrie de flux pour les MCN? D'après les commentaires du technicien en cytométrie de flux, les résultats pour les MCN étaient plus ambigus. Peut-être que la pigmentation des MCN ou encore leur morphologie particulière pourraient interférer avec la mesure de la fluorescence émise par chaque cellule. L'utilisation d'un seul donneur en cytométrie de flux comparativement à dix-huit pour la banque de soustraction et le RT-PCR pourrait également expliquer ce résultat.

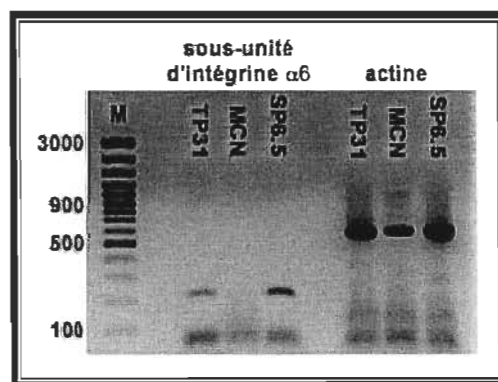


FIGURE 3.26 : Amplification PCR de la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ dans les MCN et les lignées SP6.5 et TP31. (M) marqueur.

Nos résultats vont donc dans le sens de l'étude de Falcioni *et al.* (1986), plutôt que celle de D'Ardenne *et al.* (1991) ou de Sager *et al.* (1993), puisque la sous-unité $\alpha 6$ est exprimée chez les lignées cancéreuses du mélanome uvéal, alors qu'elle est absente chez les MCN. Une autre étude intéressante portant sur les mélanomes uvéaux prémétastatiques avait déterminé que les tumeurs de phénotype non épithélioïde n'exprimaient pas les récepteurs de la laminine (Rohrbach et al., 1994) ; la lignée TP31 étant de phénotype mixte, nos résultats ne contredisent pas ces données. L'implication de la sous-unité $\alpha 6$ dans la progression tumorale diffère d'un cancer à l'autre, puisque

des études sur l'expression de la sous-unité $\alpha 6$ dans différentes tumeurs démontrent soit une augmentation (Falcioni et al., 1986; Droz et al., 1994; Friedrichs et al., 1995; Lessey et al., 1995; Rabinovitz et al., 1995; Weinell et al., 1995; Putz et al., 1999), soit une diminution ou une disparition de cette sous-unité (D'Ardenne et al., 1991; Natali et al., 1991; Sager et al., 1993; Rohrbach et al., 1994; Koukoulis et al., 1997). La présence de $\alpha 6$ dans la lignée TP31 pourrait également provenir de la présence dans la tumeur primaire d'un des patrons microvasculaires particuliers aux mélanomes ; ces patrons microvasculaires sont riches en laminine. Le patron microvasculaire en boucle est d'ailleurs retrouvé dans 88% des tumeurs primaires de patients décédés des suites de métastases et il est également présent au niveau des métastases (Rummelt et al., 1994).

La protéine *colonic and hepatic tumor over-expressed gene* (ch-TOG), dont le gène se retrouve dans la région p11.2 du chromosome 11, est impliquée dans l'organisation des fuseaux achromatiques (clone G4-31). Elle est associée au RE durant l'interphase et avec les centrosomes et les fuseaux des microtubules durant la mitose (Charrasse et al., 1998). La protéine ch-TOG est ubiquitaire dans les tissus normaux, mais elle est exprimée plus fortement dans le cerveau (Charrasse et al., 1996). Une surexpression de ch-TOG a d'ailleurs été démontrée dans des tumeurs du colon et du foie, laissant ainsi supposer un rôle de ch-TOG dans la division cellulaire et la prolifération (Charrasse et al., 1995). La surexpression de ch-TOG dans les cellules cancéreuses et durant les premiers stades de l'embryogenèse comparativement aux tissus adultes (Gard et Kirschner, 1987) peut aussi refléter une dé-différenciation des cellules tumorales par une régulation à la hausse de gènes normalement fortement exprimés durant le développement (Sell, 1993). Nous pouvons supposer que l'expression de cette protéine au sein de la lignée TP31 serait nécessaire au remodelage rapide des microtubules du cytosquelette et à l'assemblage des fuseaux dans ces cellules tumorales en division rapide.

La caluménine est une protéine liant le Ca^{2+} , qui est localisée dans le RE et qui est requise pour certaines fonctions du RE, tels le repliement et le triage des protéines (clones G4-60 et G4-65) (Yabe et al., 1997). Elle a également été retrouvée dans

l'appareil de Golgi et sous forme sécrétée (Vorum et al., 1999). Son gène est situé dans la région q32 du chromosome 7. Certaines études ont démontré une fonction pour la caluménine dans des processus pathophysiologiques, spécialement ceux associés à la transformation maligne (Chen et al., 1995; Liu et al., 1997). Pour le moment, une seule protéine interagissant avec la caluménine en présence de Ca^{2+} a été identifiée (Vorum et al., 1999). Il s'agit du *serum amyloid P component* (SAP) qui est majoritairement synthétisé par le foie et sécrété dans la circulation sanguine (Steel et Whitehead, 1994). La présence de cette protéine dans la lignée TP31 pourrait prévenir la sécrétion prématurée de certaines protéines immatures qui doivent demeurer dans le RE pour leur maturation ou encore favoriser une colonisation du foie via le SAP.

Trois transcrits codaient pour des protéines connues, mais dont la fonction n'a pas encore été déterminée. D'abord, il y avait la protéine DKFZP434I1735 (clones G2-10 et G3-74), dont le gène se situe dans la région q12 du chromosome 14, puis la protéine GW128 (clone G3-94) dont le gène se retrouve dans la région q13.12 du chromosome 20 et enfin la protéine DC2 (clone G3-104), dont le gène est situé dans la région q25 du chromosome 4. Les 29 protéines connues ont ensuite été classées en huit catégories selon leur fonction (voir figure 3.27).

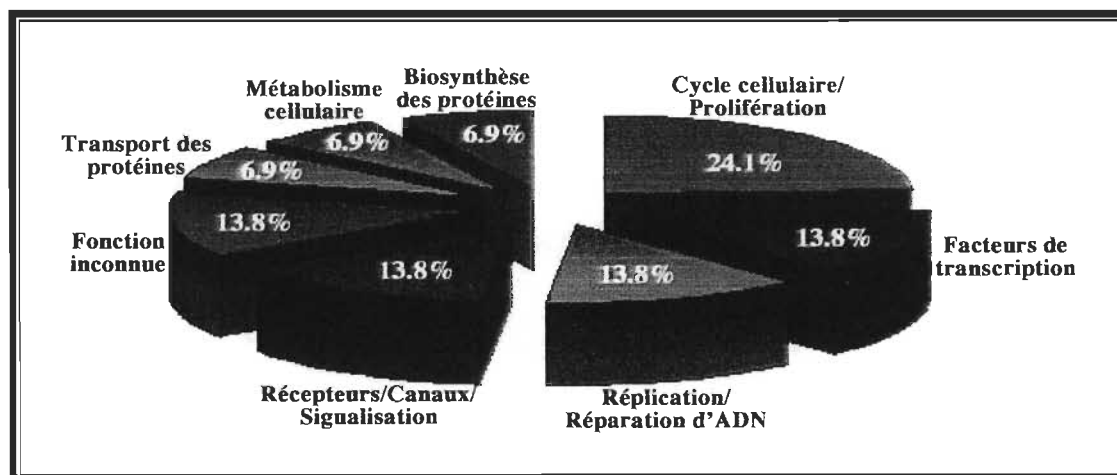


FIGURE 3.27 : Classification des clones codant pour des protéines connues selon leur fonction.

La catégorie la plus représentée est celle du cycle cellulaire/prolifération avec 24,1%. Ensuite, quatre catégories représentaient chacune 13,8% des protéines connues : facteurs de transcription, réplication/réparation de l'ADN, récepteurs/canaux/signalisation et fonction inconnue. Enfin, les trois dernières catégories, qui représentait chacune 6,9% des protéines connues, concernaient le transport des protéines, le métabolisme cellulaire et la biosynthèse des protéines. Il n'est pas surprenant de retrouver plusieurs protéines de la banque de soustraction impliquées dans le cycle cellulaire et la prolifération, étant donné que le développement d'un mélanome uvéal provient d'une interruption de l'état de dormance des mélanocytes uvéaux normaux.

Le tableau 3.5 contient la longueur du fragment, le numéro d'accèsion au NCBI, la localisation chromosomique lorsqu'elle est connue et les tissus normaux ou cancers dans lesquels étaient retrouvés les clones (50/112; 44,6%) correspondant à des ESTs ou à des HTGS. Certains clones correspondaient au même transcrit; ils ont donc été regroupés.

TABLEAU 3.5
Clones correspondant à des ESTs ou à des HTGS

Clones	Nombre de pb	# accession NCBI	LC	Tissus
G1-8	319	-BF576307	2p23.2	-muscle squelettique
G1-30	352	-BX401366	22q13.1	-carcinome utérin
G3-7	381	-CB044249		-tumeur granuleuse du colon
G3-32	372	-CA442740		-fibrosarcome
G3-91	367	-CA427616 -BU615316		-os subchondral -chondrosarcome
G1-41	624	-AL390198	20p11.21	-BAC ¹ du chromosome 20
G1-54	387	-BF801384	3q25.1	-colon
G1-78	454	-AW600258 -AW067369 -BX484924		-carcinome alvéolaire -mélanome cutané -muscle squelettique
G1-70	849	-AL136370	1q31.2	-embryon de 10 semaines
G1-93	241	-BC025313	1q32.1	-mélanome cutané
G2-13	355	-BC039469		-papillome de la vessie
G2-53	360	-BC016311		-glioblastome

G2-63	370	-BC007568		-rhabdomyosarcome
G2-67	370	-AF130080		-foie foetal
		-AK056578		-langue
		-CB045314		-tumeur granuleuse du colon
		-CB145888		-foie
		-CB240894		-épithélium pulmonaire
		-CA446828		-chondrosarcome
		-CA437215		-chondrosarcome métastatique pulmonaire
		-CB963721		-vaisseaux sanguins
		-CA412181		-cartilage ostéoarthritique
		-BU955026		-vessie, sang, cerveau, seins, colon, tissu conjonctif, intestins, reins, foie, poumons, cellules tueuses naturelles, peau, ovaires, pharynx, prostate, glandes salivaires
		-BQ130054		-insulinome
G1-110	724	-CB115924	6p22.3	-foie
		-BU172545		-mélanome cutané
		-BM545473		-hippocampe
		-BG717389		-testicules
		-BG035327		-adénocarcinome hépatique
		-BG677384		-carcinome de la peau
G2-3	641	-AW118215	11q13	-poumons fœtaux, testicules, centre germinatif des cellules B
		-CA450563		-épithélium pulmonaire
		-CA774597		-pancréas
G2-8	400	-BF801384	? ²	-colon
		-AW600258		-carcinome alvéolaire
		-AW067369		-mélanome cutané
G2-20	410	-N48689	14q32.13	-sclérose en plaques
G2-23	346	-AI820792	15q21.3	-seins
		-BG821042		-cerveau
		-AA249161		-cœur foetal
		-BG008441		-placenta
		-BU599325		-vessie, sang, cerveau, seins, colon, tissu conjonctif, intestins, reins, foie, poumons, cellules tueuses naturelles, peau, ovaires, pharynx, prostate, glandes salivaires
G2-24	874	-BG034463	7q21	-adénocarcinome mammaire
		-BM739101		-estomac
		-AA286678		-centre germinatif des cellules B
		-BE001834		-seins
G2-41	411	-BF815815	?	-colon
G4-2	500	-CB160738		-foie
G2-44	570	-BF228449	6q24.1	-cancer de l'estomac
G2-45	570	-BG360481	Xq25	-cellules souches mésenchymateuses

G2-48	284	-N48689	14q32.13	-sclérose en plaques
G3-42	585			
G3-80	423			
G4-29	431			
G2-50	486	-AW071603 -BQ267327 -N72830 -AW368674 -AA486264 -AI860661 -AI209087 -BX456786	3q13.31	-tumeur de cellules germinatives -insulinome -rate et foie fœtaux -cou -poumons -utérus -testicules -thymus
G2-66	819	-CB306231 -BU616955 -BM999375 -AW975770 -AI823408 -BM782458 -AI832203 -AI687980 -AI674198 -AI653114 -CB132602	1p22.3	-épithélium pulmonaire -chondrosarcome -fibrosarcome -métastase au colon -reins -estomac -colon -poumons, testicules, cellules B -prostate -tumeur de cellules germinatives -foie
G2-81	824	-BU753126 -BU621725 -BG533580 -BE075203 -AW390152 -AW615251 -AI077541	16q22.1	-placenta -chondrosarcome -foie -seins -estomac -reins -fœtus 8-9 semaines
G2-94	411	-BX456786 -BQ272567 -AW071603 -AI209087 -AI860661	3q13.31	-thymus -insulinome -tumeur de cellules germinatives -testicules -adénocarcinome endométrial
G3-3	874	-BQ437884 -AW090512 -CB046970 -AA331801 -AA206686	7p15.1	-leiomyosarcome utérin -cancer du cerveau -cancer du rein -embryon de 8 semaines -neuroépithélium
G3-6	531	-AY063513	Xp22.33	-poumons
G3-53	515			
G4-62	513			
G3-36	874	-BQ605338	8q24.13	-cancer du sein
G3-37	849	-AW295245 -BF826856 -BI756539 -AI581780 -BE835471 -BM906158 -AW244115		-leiomyosarcome -tête -cerveau -colon -prostate -ovaires -liposarcome mucoïde, tumeur fibreuse, histiocytome fibreux,

				tumeur stromale gastrointestinale, mésothéliome.
G3-49	874	-BX365556 -BG034463	7q21.3	-leucémie lymphoblastique aiguë -adénocarcinome mammaire
G3-51	748	-CB240746	2q31.2	-épithélium pulmonaire
G3-62	824	-CA447814 -BU177752 -BQ221850		-chondrosarcome -mélanome cutané -carcinome pulmonaire
G3-60	800	-BQ222976 -BM805209 -BG742284 -BQ216417 -BU198665 -CB164667 -BM856860	2p11.2	-carcinome embryonnaire testiculaire -hippocampe -peau -carcinome pulmonaire -cellules dendritiques -foie -estomac
G3-79	921	-AL710270 -BE883093 -AW236358 -BU429108 -BI004652 -BF906182 -H10439 -AL135634 -BQ320177	10q23.31	-muscle squelettique -leiomyosarcome utérin -sang -centre germinale des cellules B -tête -moelle -cerveau nouveau-né 73 jours -mélanome cutané -colon
G3-84	220	-AL554573	6q25.1	-placenta
G4-1	181	-AL525482 -CB136216 -BQ441833 -BQ051063 -BI906731 -BI597574 -BF801782 -AU125564 -AI139489 -Z30310		-neuroblastome -foie -testicules -leiomyosarcome utérin -leucocytes -hypothalamus -colon -tératocarcinome -utérus gestant -cœur
G4-21	700	-BF810198	2q21.2	-colon
G3-5	874	-BG875496		-seins
G4-72	1155	-BX282063 -BX406226 -AL528937 -BI460566	2q33.1	-lymphome -foie foetal -neuroblastome -testicules
G4-91	442	-CB120649	6p21.1	-foie
G4-120	736	-AK024294 -AK025753	6p24.3	-tératocarcinome -carcinome hépatique

¹Bacterial artificial chromosome²Localisation chromosomique inconnue

La majorité des clones correspondaient à plusieurs ESTs mais certains, plus intéressants, concordaient avec un EST retrouvé dans un seul tissu ou chromosome (en excluant les ESTs de la vision et de l'audition qui sont regroupés dans le tableau 3.6). Par exemple, les clones G1-8 (muscle squelettique), G1-41 (BAC du chromosome 20), G1-70 (embryon de 10 semaines), G2-20, G2-48, G3-42, G3-80 et G4-29 (sclérose en plaques), G2-44 (cancer de l'estomac), G2-45 (cellules souches mésenchymateuses), G3-6, G3-53 et G4-62 (poumons) et G4-91 (foie). Le clone G1-70 est très intéressant, car il a été retrouvé dans un embryon et pourrait refléter une dé-différenciation des cellules tumorales de la lignée TP31 par une régulation à la hausse de gènes qui sont normalement très exprimés durant les premiers stades embryonnaires (Sell, 1993). Ensuite, le clone G2-45 est également intéressant, puisqu'il est retrouvé dans les cellules souches mésenchymateuses qui sont les précurseurs de différentes cellules dont les ostéoblastes (cellules osseuses), les myoblastes (cellules musculaires), les chondroblastes (cellules des cartilages) et les adipoblastes (cellules adipeuses) (Peng et Huard, 2003). De plus, lors du développement embryonnaire, les mélanoblastes (précurseurs des mélanocytes) migrent à travers le mésenchyme, interagissant ainsi avec ce type de tissu (Yu, 2002). Le clone G4-91 a également un intérêt, car le seul EST correspondant à ce transcrit a été cloné dans le foie, l'organe atteint dans 97% des cas de mélanomes uvéaux (Spencer, 1986).

Parmi ces clones correspondant à des ESTs ou à des HTGS, certains concordaient avec des ESTs de la vision et de l'audition qui sont regroupés au sein de la *National Eye Institute Bank* (*NEIBank*; voir tableau 3.6). Le tableau 3.6 contient le numéro d'accès au *NEIBank*, la localisation chromosomique lorsqu'elle est connue et les tissus oculaires ou auditifs dans lesquels étaient retrouvés ces 21/112 clones (18,8%) correspondant à des ESTs de la vision et de l'audition. Plusieurs clones ont été retrouvés dans la banque d'ESTs d'œil foetal dont les clones G1-8, G1-30, G3-7, G3-32, G3-91, G1-93, G2-13, G2-53, G2-63, G2-67, G1-110, G2-3, G3-51 et G3-62, ce qui pourrait laisser croire à une dé-différenciation des cellules de la lignée TP31, mais ces clones étaient également retrouvés dans d'autres tissus oculaires ou non oculaires adultes (voir tableau 3.5).

Quelques clones ont également été retrouvés dans la banque d'ESTs EPR/choroïde dont les clones G2-3, G3-36, G3-37 et G3-79, mais ils correspondaient également à plusieurs ESTs oculaires ou non oculaires (voir tableaux 3.5 et 3.6).

TABLEAU 3.6
Clones correspondant à des ESTs de la vision et de l'audition

Clones	# accession <i>NEIBank</i>	LC	Tissus
G1-8	-ho25a10 -BM680441	2p23.2	-canal trabéculaire -œil foetal
G1-30 G3-7 G3-32 G3-91	-AA017263 -BM723471 -ho07c05	22q13.1	-rétine -œil foetal -canal trabéculaire
G1-93 G2-13 G2-53 G2-63 G2-67	-ho16d03 -AW023908 -BM720369 -H92141	1q32.1	-canal trabéculaire -cochlée -œil foetal -rétine
G1-110	-BM721238	6p22.3	-œil foetal
G2-3	-bx03g12 -fs28a08 -cs20h01 -BM723127 -H41052	11q13.1	-iris -cristallin -EPR/choroïde -oeil foetal -rétine
G2-41 G4-2	-W22076	?	-rétine
G2-66	-BI492838	1p22.3	-cochlée
G2-81	-AW019923	16q22.1	-cochlée
G3-36 G3-37	-cs89f07	8q24.13	-EPR/choroïde
G3-51 G3-62 G3-79	-BM721768 -cs78e05	2q31.2 10q23.31	-œil foetal -EPR/choroïde

Enfin, plusieurs clones concordaient avec des ESTs de cochlée (G1-93, G2-13, G2-53, G2-63, G2-67, G2-66 et G2-81), mais aucun n'était spécifique à celle-ci (voir tableaux 3.5 et 3.6). La cochlée contenant également des mélanocytes (Yu, 2002), il

existerait une certaine homologie entre le tractus uvéal et l'oreille interne. Certaines pathologies comme, par exemple, le syndrome de Waardenburg, entraînent d'ailleurs des anomalies de l'uvée et de la cochlée (Baldwin et al., 1995). Tous les clones codant pour des protéines connues ou correspondant à des ESTs ou à des HTGS ont ensuite été classés selon leur localisation chromosomique (voir figure 3.28). Aucun clone n'a été localisé sur les chromosomes 5, 9, 12, 13, 18, 19, 21 et Y et trois clones (G2-8, G2-41-G4-2) n'ont pu être associés à un chromosome (2,5%).

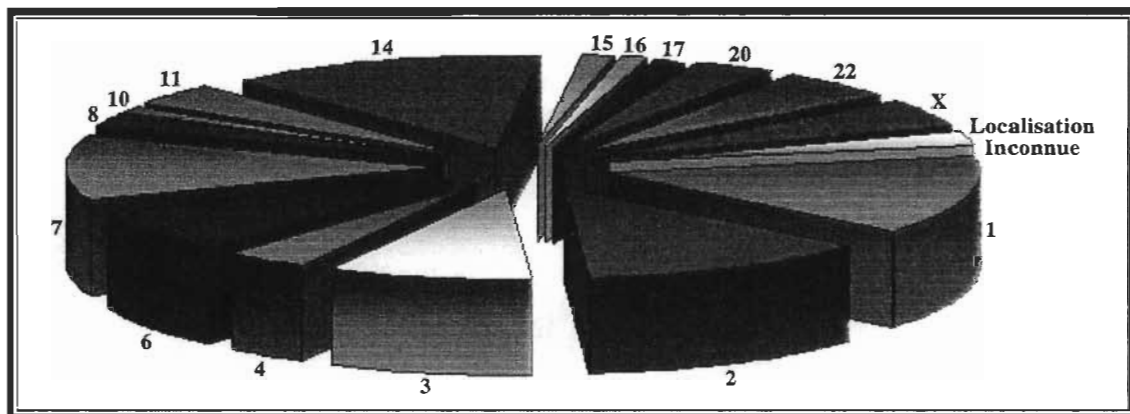


FIGURE 3.28 : Classification des clones codant pour des protéines connues ou correspondant à des ESTs ou à des HTGS selon leur localisation chromosomique.

D'abord, les chromosomes 1 (13,9%) et 14 (13,9%) sont les chromosomes auxquels ont été associés le plus de clones. Ensuite, viennent les chromosomes 2 (12,7%), 7 (11,4%), 3 (8,9%), 6 (7,6%), 22 (5,1%), X (5,1%), 4 (3,8%), 11 (3,8%), 20 (3,8%), 8 (2,5%), 10 (1,3%), 15 (1,3%), 16 (1,3%) et 17 (1,3%). Le profil du caryotype de la lignée TP31 (effectué par le laboratoire de génétique du CHUL, à la demande de Mélanie Bérubé du laboratoire de S.L. Guérin; voir figure 3.29) permet d'expliquer certains résultats.

Puisque la lignée TP31 provient d'un donneur masculin, il y a donc présence des chromosomes X et Y. Ensuite, nous pouvons remarquer de nombreuses anomalies chromosomiques au sein de la lignée TP31, dont des copies supplémentaires des chromosomes 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 16, 19, 20 et 22, et un gain sur un des allèles du chromosome 13. Cette lignée cancéreuse ne présente aucune délétion de chromosome

complet. Les copies supplémentaires des chromosomes 1, 3 et 7 pourraient expliquer le grand nombre de clones associés à ces chromosomes. Cependant, malgré l'absence de copies supplémentaires des chromosomes 2 et 14, plusieurs clones y sont tout de même associés.

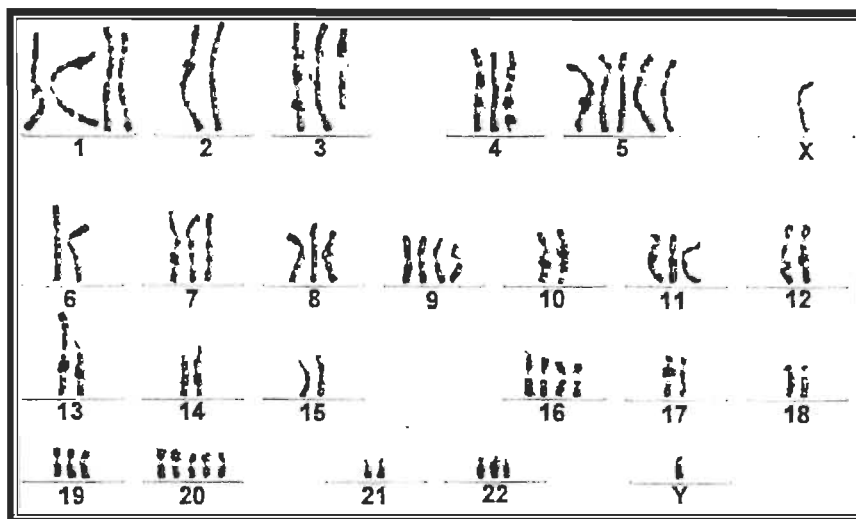


FIGURE 3.29 : Caryotype de la lignée TP31 par analyse caryotypique spectrale.

Ensuite, la présence de copies supplémentaires des chromosomes 5, 9 et 19 n'est pas reflétée dans la banque de soustraction, car aucun clone n'a été localisé sur ces chromosomes. Enfin, malgré les copies supplémentaires des chromosomes 4, 8, 11, 16, 20 et 22, il y a peu de clones associés à ces derniers. Toutefois, il ne faut pas oublier que la banque de soustraction favorise l'identification de gènes spécifiques à la lignée TP31, gènes qui ne sont pas nécessairement les plus représentés.

L'application de la cytogénétique au pronostic des tumeurs solides est sévèrement limitée par les difficultés techniques associées à l'obtention d'une bonne qualité d'étalement des métaphases (Mertens et al., 1994) et est également compliquée par l'extrême complexité des aberrations chromosomiques fréquemment observées dans les tumeurs malignes solides (Johansson et al., 1996). Cependant, différents changements chromosomiques ont été identifiés dans plusieurs études cytogénétiques du mélanome uvéal : perte de la bande p36 du chromosome 1, monosomie du chromosome 3 (50-56% des tumeurs), anomalies du chromosome 6 (translocation de la bande p21, gain d'un bras

court complet, perte de la bande q16-24 (Naus et al., 2001)) et gains sur le bras q du chromosome 8 (bandes q21.1-21.2 et q23-24 (Naus et al., 2001)) (Horsman et White, 1993; Prescher et al., 1995; Sisley et al., 2000). Certaines anomalies sont associées fortement avec une réduction de la survie du patient comme la monosomie du chromosome 3 et les gains sur le bras q du chromosome 8 (Prescher et al., 1996; Sisley et al., 1997), alors que d'autres sont associées à un meilleur pronostic; c'est le cas d'une délétion de la bande p21-23 du chromosome 1 (Aalto et al., 2001) et des anomalies du chromosome 6 (White et al., 1998). Aucune de ces anomalies ne semble être présente dans la lignée TP31. D'abord, la bande 1p21-23 est retrouvée dans cette lignée puisque au moins un clone (G2-66) est situé dans cette région. Il est impossible de confirmer cependant si la bande 1p36 a été perdue, car aucun clone ne correspond à cette région et la méthode utilisée pour l'obtention du caryotype ne permet pas d'identifier précisément les régions supplémentaires ou manquantes. Ensuite, notre lignée ne fait pas partie des 50-56% des tumeurs avec monosomie du chromosome 3, puisqu'elle possède trois copies du chromosome 3. Bien que les tumeurs avec une disomie du chromosome 3 donnent rarement naissance à des métastases (Prescher et al., 1996), le patient à l'origine de la lignée TP31 est décédé des suites d'une métastase hépatique. Il existe deux locus de susceptibilité au mélanome uvéal : les bandes q24-26 (UVM1) et p25 (UVM2) du chromosome 3 (Tschentscher et al., 2001). L'équipe de Tschentscher (2001) a suggéré que deux gènes suppresseurs de tumeurs joueraient un rôle dans les mélanomes uvéaux métastatiques : UVM1 (3q) et UVM2 (3p25). L'implication de ces deux gènes suppresseurs de tumeurs pourrait expliquer la perte du chromosome 3 entier chez les mélanomes uvéaux métastatiques (Tschentscher et al., 2001). Quant à la présence d'anomalies du chromosome 6, nous pouvons seulement confirmer qu'il n'y a pas eu délétion de la bande 6q16-24, car les clones G2-44 et G4-91 sont situés dans cette région. Concernant les gains sur le chromosome 8, nous ne pouvons confirmer leur présence, puisque l'analyse caryotypique spectrale ne le permet pas. Horsthemke et son équipe ont suggéré qu'un oncogène situé sur le bras q du chromosome 8 serait impliqué dans la formation et la progression du mélanome uvéal, d'où la multiplication observée des allèles du chromosome 8 (Horsthemke et al., 1992).

Finalement, les 33/112 clones (29,5%) qui étaient inconnus dans les banques de données ont été regroupés dans le tableau 3.7 qui contient seulement les clones et la longueur de leur fragment.

TABLEAU 3.7
Clones inconnus

Clones	Nombre de pb
G1-4	352
G1-6	523
G4-68	570
G1-16	804
G2-75	616
G3-70	682
G1-33	648
G1-35	832
G4-50	800
G1-62	985
G4-96	849
G1-79	658
G3-57	500
G4-56	486
G1-84	413
G2-59	515
G1-109	918
G2-15	963
G2-40	700
G3-48	963
G2-42	648
G3-29	900
G2-77	531
G2-89	531
G3-4	931
G3-83	619
G4-116	985
G2-92	341
G3-41	1246
G3-71	849
G4-66	500
G4-75	473
G4-76	157

Les clones correspondant au même transcrit ont été regroupés. Un tiers des clones correspondait donc à des transcrits inconnus et il sera intéressant de vérifier leur présence dans des tissus normaux et d'autres lignées cancéreuses.

Pour vérifier la présence des clones intéressants (clones inconnus ou correspondant à des ESTs ou à des HTGS) dans d'autres tissus et lignées cancéreuses, des amplifications PCR ont été effectuées. Cette étape permettra de sélectionner les clones spécifiques au mélanome uvéal.

3.2.5 Amplification PCR des clones intéressants avec différents tissus normaux et lignées cancéreuses

L'utilisation de l'ADNc d'une grande variété de tissus normaux et de lignées cancéreuses a permis de confirmer si les clones intéressants étaient spécifiques au mélanome uvéal. L'ADNc des MCN a été utilisé avec toutes les amorces pour s'assurer de l'absence dans ces cellules des clones déterminés comme étant spécifiques à la lignée TP31. Une première amplification PCR avec des amorces pour l'actine a d'abord permis de vérifier l'intégrité des ADNc des tissus normaux et des lignées cancéreuses utilisés (voir figure 3.30). La lignée cancéreuse HeLa dérive d'un cancer du col de l'utérus, la lignée cancéreuse Jurkat provient d'une leucémie lymphoblastique aiguë, les lignées cancéreuses SP6.5, SP8.0 et TP31 dérivent de tumeurs primaires du mélanome uvéal et la lignée hépatique H79 provient d'une métastase hépatique du mélanome uvéal.

Un fragment d'actine de 600 pb a été amplifié de façon assez équivalente dans tous les tissus normaux et lignées cancéreuses testés (voir figure 3.30). Nous avons donc débuté l'amplification PCR de certains clones sélectionnés parmi les clones inconnus (clone G2-15) ou correspondant à des ESTs (clones G2-8, G2-13, G2-44 et G2-81, voir figures 3.31, 3.32, 3.33, et 3.34, respectivement).

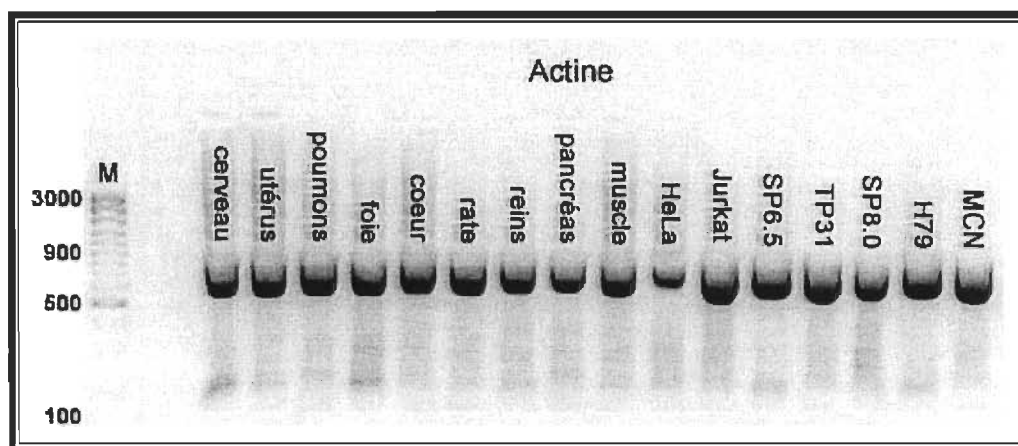


FIGURE 3.30 : Vérification de l'intégrité de l'ADNc des tissus normaux et des lignées cancéreuses. (M) marqueur.

Le transcrit G2-8 d'une longueur de 280 pb était présent dans tous les tissus, excepté dans les MCN (voir figure 3.31).

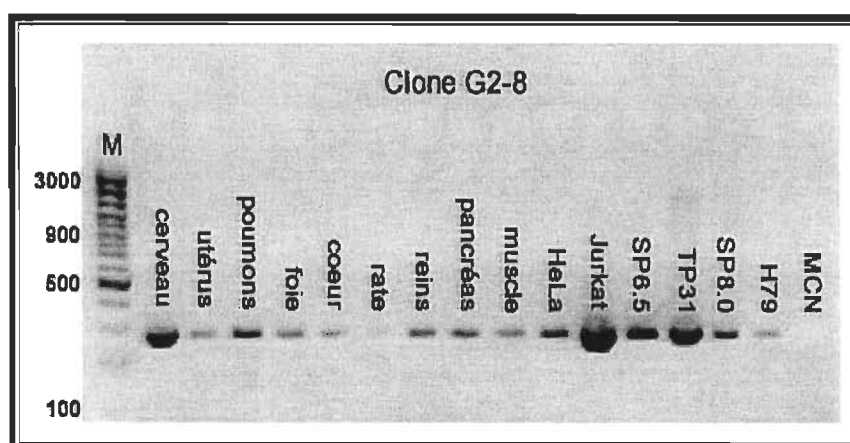


FIGURE 3.31: Vérification de la spécificité du clone G2-8 par amplification PCR avec l'ADNc de tissus normaux et de lignées cancéreuses. (M) marqueur.

Il était plus fortement exprimé dans le cerveau et les lignées cancéreuses Jurkat, SP6.5 et TP31. Ce résultat a permis de confirmer l'absence de ce transcrit dans les MCN, mais également d'éliminer ce clone de la liste des marqueurs potentiels spécifiques au mélanome uvéal, puisqu'il est ubiquitaire.

Le transcrit G2-13 d'une longueur de 253 pb était présent dans tous les tissus, même dans les MCN (voir figure 3.32).

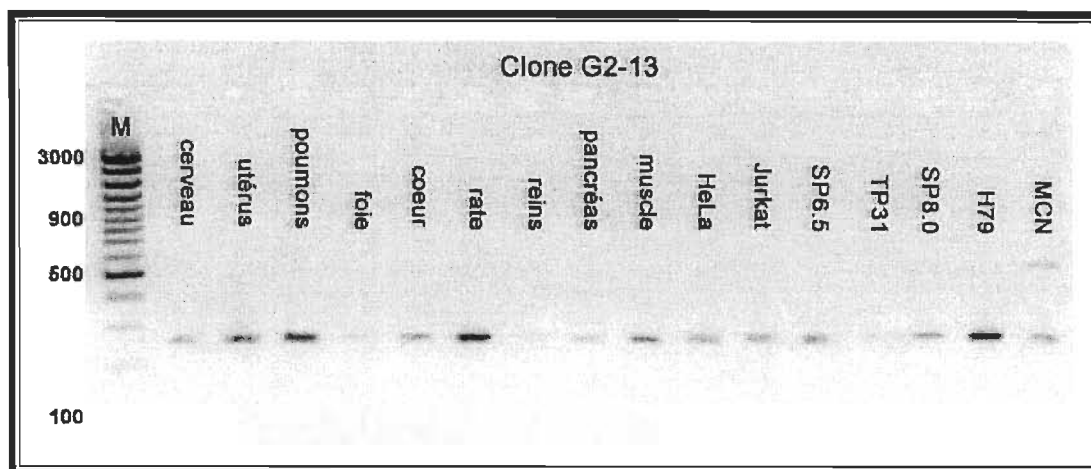


FIGURE 3.32 : Vérification de la spécificité du clone G2-13 par amplification PCR avec l'ADNc de tissus normaux et de lignées cancéreuses. (M) marqueur.

Il était cependant plus fortement exprimé dans les poumons, la rate et la lignée hépatique H79. Il était présent également dans la lignée TP31, mais plus faiblement que dans les MCN, où l'on pouvait également remarquer la présence d'une deuxième bande d'environ 600 pb qui était absente dans tous les autres tissus et lignées. Ce résultat a permis de détecter la présence de ce transcrit dans les MCN, ce qui pourrait être expliqué de deux façons: (1) le clone G2-13 ferait partie du 5% de clones non spécifiques à la lignée TP31 qui étaient classés dans la première catégorie de clones (95% de probabilité d'être spécifiques à la lignée TP31) (voir tableau 3.2) ou (2) le résultat du criblage différentiel pour ce clone a été mal interprété car, d'après le résultat obtenu, le clone G2-13 aurait dû être classé dans la troisième catégorie de clones (variants épissés ou mutations spécifiques à la lignée TP31) (voir tableau 3.2). Ce clone a donc été également éliminé de la liste des marqueurs potentiels spécifiques au mélanome uvéal, puisqu'il était ubiquitaire et présent dans les MCN. Il serait par contre intéressant de caractériser la bande de 600 pb que l'on observe seulement dans les MCN.

Les amorces utilisées pour le clone G2-15 n'ont pas fonctionné. Nous aurions dû obtenir un fragment de 862 pb. Il faudra donc faire synthétiser de nouvelles amorces afin de vérifier si ce clone est spécifique au mélanome uvéal.

Nous avons obtenu un résultat très intéressant avec le transcrit G2-44, d'une longueur de 431 pb, qui était présent seulement dans la lignée cancéreuse HeLa (très faiblement) et les lignées cancéreuses du mélanome uvéal (SP6.5, TP31, SP8.0 et H79) (voir figure 3.33).

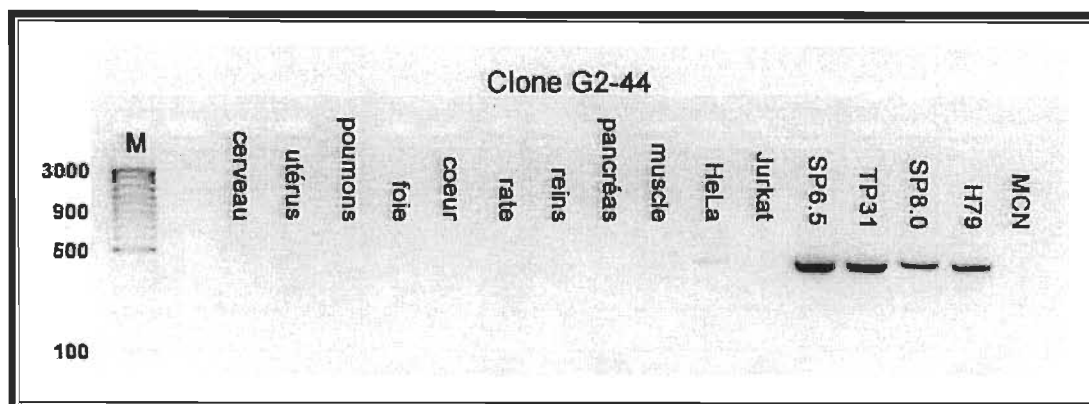


FIGURE 3.33 : Vérification de la spécificité du clone G2-44 par amplification PCR avec l'ADNc de tissus normaux et de lignées cancéreuses. (M) marqueur.

Ce résultat a permis de confirmer l'absence de ce transcrit dans les MCN, mais également d'inclure ce clone dans la liste des marqueurs potentiels spécifiques au mélanome uvéal qu'il faudrait caractériser, puisqu'il est fortement présent seulement dans les lignées cancéreuses du mélanome uvéal. Cependant, lors de l'analyse bioinformatique, la séquence du clone G2-44 correspondait également à un EST amplifié à partir d'un cancer de l'estomac (voir tableau 3.5).

Le transcrit G2-81 d'une longueur de 519 pb était présent faiblement dans plusieurs tissus et lignées cancéreuses (cerveau, foie, reins, HeLa, TP31 et SP8.0), mais également dans les MCN (voir figure 3.34). La présence de ce clone dans les MCN pourrait s'expliquer par le fait que certains transcrits classés dans la deuxième catégorie de clones (voir tableau 3.2) correspondraient à des artéfacts selon la compagnie *Clontech*. Ce clone a donc été éliminé de la liste des marqueurs potentiels spécifiques au mélanome uvéal, puisqu'il était présent dans plusieurs tissus et lignées, et également dans les MCN. Finalement, parmi les cinq clones testés, seul le clone G2-44 sera caractérisé.

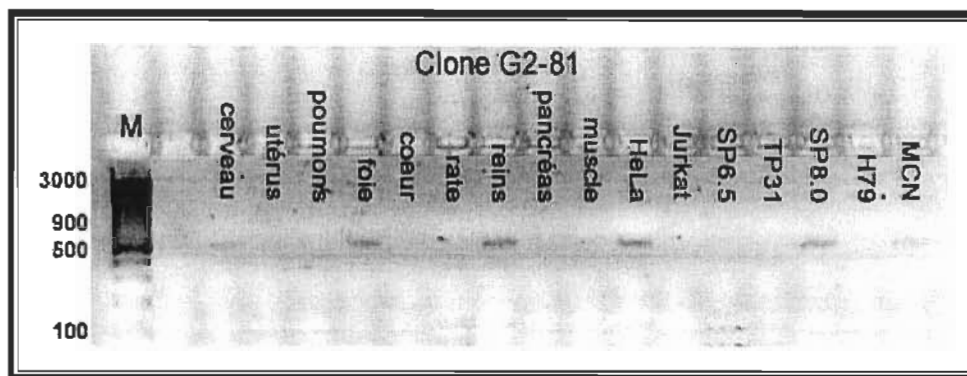


FIGURE 3.34 : Vérification de la spécificité du clone G2-81 par amplification PCR avec l'ADNc de tissus normaux et de lignées cancéreuses. (M) marqueur.

3.2.6 Comparaison des résultats de la banque de soustraction « lignée TP31 – MCN » avec d'autres études sur le mélanome uvéal ayant utilisé les techniques de banque de soustraction et de criblage de micropuces d'ADNc (*microarray*).

Une seule étude concernant le mélanome uvéal ayant utilisé la technique de banque de soustraction a été publiée jusqu'à maintenant. L'équipe de Walker *et al.* (2002) a construit une banque de soustraction, afin d'identifier les gènes exprimés différemment entre la lignée cancéreuse épithélioïde Mel 290 dérivée d'un mélanome uvéal et les mélanocytes uvéaux normaux. Dans cet article, l'accent a été mis sur deux protéines déjà connues, la *cysteine-rich 61* (CYR61) et le *tissue factor* (TF) (O'Brien *et al.*, 1990; Edgington *et al.*, 1991), au détriment de tous les autres gènes obtenus à l'aide de leur banque de soustraction qui n'étaient pas mentionnés. Ainsi, ces deux facteurs de croissance angiogénique sont exprimés fortement dans les lignées cancéreuses épithélioïdes dérivées de mélanomes uvéaux comparativement aux mélanocytes uvéaux normaux ou les lignées cancéreuses fusiformes dérivées de mélanomes uvéaux. Ces résultats ont également été confirmés *in vivo* (Walker *et al.*, 2002) sur des coupes de mélanomes uvéaux par immunohistochimie. Les deux gènes de ces protéines sont retrouvés sur le chromosome 1 dans les régions p22.3 (CYR61) et p21-p22 (TF) et une duplication de ces gènes à la suite d'un débalancement

chromosomal pourrait expliquer les niveaux élevés de CYR61 et TF mesurés lors de cette étude chez les cellules épithélioïdes du mélanome uvéal (Walker et al., 2002). Une délétion de la bande p21-23 du chromosome 1 dans des tumeurs de mélanomes uvéaux a d'ailleurs été corrélée à un meilleur pronostic (Aalto et al., 2001). Enfin, une corrélation existe entre l'expression de ces deux protéines et le nombre de vaisseaux sanguins, ce qui contribuerait au phénotype angiogénique du mélanome uvéal (Walker et al., 2002). Une avenue thérapeutique ayant comme cible le TF est à envisager, puisque ce facteur angiogénique est exprimé de façon sélective dans les vaisseaux sanguins des tumeurs et non dans les vaisseaux matures (Hu et Garen, 2001).

Les études concernant le mélanome uvéal ayant utilisé le criblage de micropuces d'ADNc sont un peu plus nombreuses. En fait, nous pouvons retrouver six articles sur ce sujet (Maniotis et al., 1999; Seftor et al., 2001; Seftor et al., 2002; Hendrix et al., 2003; Tschentscher et al., 2003; Van Der Velden et al., 2003). Le criblage de micropuces d'ADNc effectué par l'équipe de Maniotis *et al.* (1999) compare l'expression relative de 5000 gènes, sélectionnés pour leur rôle critique dans la formation de canaux vasculaires, chez une lignée de mélanome uvéal fortement invasif et métastatique versus une lignée de mélanome uvéal peu invasif, toutes deux dérivées du même patient. De façon sommaire, sur les 210 gènes connus qui étaient exprimés de façon différentielle dans ces populations de tumeurs, environ 15 ont été associés précédemment avec un phénotype endothélial/vasculaire (Maniotis et al., 1999). Par exemple, l'expression des gènes suivants était altérée dans les cellules plus invasives : la tyrosine kinase avec des domaines homologues aux Ig et EGF (TIE-1), le *urokinase-type plasminogen activator* (PLAU) (impliqué dans la formation et la maturation des vaisseaux) (McCarthy et al., 1998), la *epithelial cell kinase* (ECK) (récepteur de la tyrosine kinase) et la kératine 8 (filament intermédiaire), lesquels supportent le phénotype pseudo-embryonnaire démontré par cette lignée de mélanome fortement invasif (Hendrix et al., 1998). D'autres gènes qui peuvent générer des molécules permettant la formation de canaux microvasculaires sont surexprimés chez la lignée de mélanome agressif, incluant le *connective tissue growth factor* (CTGF), les collagènes I et VI et la fibronectine (Daniels et al., 1996). En résumé, cette étude a permis de démontrer une réversion génétique vers

un génotype pluripotent pseudo-embryonnaire chez la lignée de mélanome fortement agressif. Les auteurs soulignent également que la formation de microcirculation par des cellules autres que les cellules endothéliales n'a jamais été rapportée précédemment dans le contexte de la progression tumorale, sauf dans les tissus embryonnaires normaux, ce qui représente une caractéristique intéressante du mélanome uvéal (Maniotis et al., 1999).

La deuxième étude, effectuée par l'équipe de Seftor *et al.* (2001) comparait également l'expression relative de certains gènes chez une lignée de mélanome uvéal fortement invasif et métastatique versus une lignée de mélanome uvéal peu invasif, toutes deux dérivées du même patient. Ils ont identifié plusieurs gènes candidats qui seraient importants dans le mimétisme vasculogénique selon leur implication dans l'invasion tumorale, la motilité cellulaire, le remodelage de la MEC et le développement de la membrane basale. Ainsi, une augmentation de l'expression de la laminine 5 (monomère $\gamma 2$) et des *matrix metalloproteinases 1, 2, 9 et 14* (MMP-1, -2, -9, -14) a été observée (Seftor et al., 2001). Les laminines sont des constituants majeurs de la MEC de la membrane basale et jouent un rôle actif dans la croissance des axones, la formation de métastases, l'adhésion et la migration des cellules, et l'angiogenèse (Malinda et Kleinman, 1996; Malinda et al., 1999; Colognato et Yurchenco, 2000). L'expression de la laminine serait également un prérequis pour l'embryogenèse et la formation de la membrane basale dans les tissus en développement (Colognato et Yurchenco, 2000). Les laminines peuvent subir des clivages protéolytiques attribuables à des modifications post-traductionnelles donnant ainsi naissance à des fragments de laminine (Malinda et Kleinman, 1996; Malinda et al., 1999; Colognato et Yurchenco, 2000). Dans ce contexte, la dégradation de la laminine associée au renouvellement de la membrane basale et au remodelage tissulaire exposerait et rendrait actives des séquences spécifiques qui sont normalement enfouies et non disponibles avant une dégradation protéolytique. Ces séquences seraient capables de médier des interactions cellulaires particulières (Malinda et Kleinman, 1996; Malinda et al., 1999; Colognato et Yurchenco, 2000). La laminine 5 clivée peut ainsi altérer ou réguler le comportement migratoire de certaines cellules qui est médié par les intégrines (Giannelli et al., 1997; Colognato et

Yurchenco, 2000; Koshikawa et al., 2000). Enfin, la laminine 5 est impliquée dans la régulation du mimétisme vasculogénique via son clivage protéolytique par des MMP spécifiques (Seftor et al., 2001).

La troisième étude, celle de Seftor *et al.* (2002), a comparé l'expression génique de cellules très agressives d'une métastase du mélanome uvéal versus des cellules non agressives d'une métastase du mélanome uvéal, toutes deux dérivées du même patient. Sur 5000 gènes, 210 gènes connus étaient exprimés différemment entre les deux types de cellules. Plusieurs de ces gènes sont associés à de multiples phénotypes moléculaires, incluant ceux des cellules souches, épithéliales, fibroblastiques et endothéliales (Seftor et al., 2002). En fait, la signature moléculaire de la lignée agressive contient plusieurs phénotypes, ce qui ressemble à un génotype pluripotent pseudo-embryonnaire (Seftor et al., 2002). Il est tentant de spéculer que l'habileté des cellules agressives du mélanome uvéal à métastaser et à échapper à la surveillance immunitaire pourrait provenir en partie de l'expression de plusieurs antigènes spécifiques à des phénotypes cellulaires donnant ainsi une apparence non tumorale à ces cellules (Seftor et al., 2002). Voici quelques exemples de gènes qui étaient surexprimés chez ces cellules de la lignée agressive comparativement aux cellules de la lignée moins agressive : la *neutral endopeptidase* (CALLA), le *rho GDP dissociation inhibitor* (ARHGDIB), le PAX8, le *leukemia inhibitory factor* (LIF) et le *hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1* (HCLS1). L'expression de PAX8 par les cellules agressives du mélanome uvéal peut être reliée à la fonction de différenciation de ce gène, qui a été démontrée précédemment lors de la différenciation des cellules thyroïdiennes (Pasca di Magliano et al., 2000). Seftor *et al.* (2002) ont approfondi l'analyse de deux gènes sous-exprimés par la lignée agressive, soit le *MHC class II antigen M alpha* (HLA-DM) et la *membrane glycoprotein M6b* (GPM6B), dont l'absence faciliterait l'invasion et la formation de métastases. Le HLA-DM est impliqué dans la présentation de l'antigène de classe II (Morris et al., 1994) et des différences dans la voie de présentation de l'antigène de classe II ont un impact sur la reconnaissance des cellules cancéreuses par les cellules T CD4+ (Walter et al., 2000). Une absence des molécules associées aux HLA de classe II a déjà été corrélée avec l'invasion et le phénotype métastatique du mélanome (Hendrix

et al., 1990). Ensuite, la perte de l'expression de GPM6B, qui est importante dans le développement neuronal (Olinsky et al., 1996), peut indiquer une perte des marqueurs de différenciation de la crête neurale; les cellules de mélanome agressif deviennent alors moins différenciées et pluripotentes. Finalement, les gènes surexprimés par les cellules agressives ont été associés aux chromosomes 1, 2, 3, 7 et 11, alors que les gènes sous-exprimés ont été associés aux chromosomes 1, 3, 10 et 16 (Seftor et al., 2002).

La quatrième étude, celle de Hendrix *et al.* (2003) est une revue des résultats de certaines études mentionnées ci-dessus. Par contre, ils ont approfondi l'étude de l'expression de l'ECK et de la cadhérine VE (Hendrix et al., 2003). Ainsi, ils ont supposé que la cadhérine VE médiait la localisation de l'ECK au niveau de la membrane, où elle peut être alors phosphorylée. De plus, la phosphorylation de l'ECK peut faciliter la phosphorylation de la cadhérine VE, entraînant ainsi une perte de l'adhésion cellule-cellule et permettant ainsi une augmentation de la migration, de l'invasion et du mimétisme vasculogénique (Hendrix et al., 2003). Ils ont également déterminé que l'ECK interagissait avec la *focal adhesion kinase* (FAK). Un autre effecteur potentiel de l'ECK et de la cadhérine VE est la *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K). Elle jouerait un rôle important dans le mimétisme vasculogénique : par son action sur l'ECK et la cadhérine VE, de concert avec Rac-1 et Cdc42, elle permettrait la formation de réseaux pseudo-vasculogéniques (Hendrix et al., 2003). Le modèle qu'ils ont développé est le suivant : la liaison des molécules de cadhérine VE aux cellules adjacentes entraîne la localisation de l'ECK au niveau de la membrane où elle lie son ligand, l'éphrine-A1, et est ensuite phosphorylée. La phosphorylation de l'ECK provoque la conversion de Rac1 et Cdc42 sous leur forme active (liée au GTP). Cette conversion entraîne la formation de lamellipodes et de filopodes, et également le recrutement de FAK au niveau des adhésions focales nouvellement formées. Une fois à la membrane, la FAK est capable d'interagir avec l'ECK et les intégrines, permettant ainsi leur phosphorylation et leur activation, lesquelles en retour activent la paxilline, entraînant une augmentation du remodelage des adhésions focales et de la migration cellulaire. Enfin, l'activation de PI3K augmente la production des niveaux de MMP-2, ce qui favorise la formation de réseaux pseudo-vasculogéniques (Hendrix et al., 2003).

La cinquième étude, celle de Tschentscher *et al.* (2003) a utilisé une méthode légèrement différente, soit celle du criblage de micropuces d'oligonucléotides, afin de comparer l'expression génique (12 500 gènes) de tumeurs avec ou sans monosomie du chromosome 3 (Tschentscher *et al.*, 2003). Cette étude a démontré que l'expression de sept gènes était complètement perdue dans les tumeurs avec monosomie comparativement à des tumeurs avec disomie. Sur les sept gènes absents dans les tumeurs avec monosomie, trois sont localisés sur le chromosome 3 (Tschentscher *et al.*, 2003). Deux de ces gènes, CHL1 (impliqué dans la migration et la différenciation des cellules neuronales) et fls485 (pas de fonction attribuée ; isolé dans le foie foetal) pourraient être des suppresseurs de tumeurs, puisqu'ils sont localisés à l'intérieur ou près du locus de susceptibilité au mélanome uvéal UVM2, en position 3p25. Une plus faible expression de CHL1 a d'ailleurs été retrouvée dans une lignée de mélanome uvéal très invasive, comparativement à une lignée moins invasive, les deux lignées dérivant de la même métastase (Seftor *et al.*, 2002). Cependant, des analyses mutationnelles sur plusieurs tumeurs avec monosomie du chromosome 3 n'ont pas révélé d'altérations structurales ou épigénétiques au sein de ces deux gènes (Tschentscher *et al.*, 2003). L'expression de plusieurs autres gènes était réduite dans les tumeurs avec monosomie comme, par exemple, celui de l'ostéopontine qui code pour une cytokine liant plusieurs intégrines et une variété d'isoformes de CD44. Dans plusieurs cancers, l'expression de l'ostéopontine est un bon marqueur du stade métastatique (Weber et Ashkar, 2000), mais pas dans les cas de mélanomes uvéaux (Tschentscher *et al.*, 2003). Le *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMP) est également peu ou pas exprimé dans les tumeurs avec monosomie, ce qui contribuerait au potentiel hautement métastatique de ces tumeurs (Tschentscher *et al.*, 2003). Il est bien établi que les tumeurs avec disomie donnent rarement naissance à des métastases (Prescher *et al.*, 1996). Cela suggère que le programme génétique des tumeurs avec disomie ne permet pas d'acquérir les changements génétiques nécessaires à la formation de métastases (Tschentscher *et al.*, 2003).

La dernière étude a été effectuée par van der Velden *et al.* (2003) et elle comparait l'expression de 1 176 gènes associés avec le cancer, entre une lignée de tumeur primaire

du mélanome uvéal et deux lignées de métastases du mélanome uvéal, toutes deux dérivées du même patient (van Der Velden et al., 2003). Soixante-trois gènes ont ainsi été identifiés : 40 gènes étaient surexprimés et 23 sous-exprimés dans la lignée de tumeur primaire. Ces gènes sont impliqués dans plusieurs processus, dont l'angiogenèse, l'apoptose, la stimulation des macrophages et la régulation de la MEC (van Der Velden et al., 2003). TIMP3 est l'un des gènes sous-exprimés dans les lignées de métastases. Ainsi, la lignée primaire du mélanome uvéal exprimait seulement 20% de la quantité d'ARNm de TIMP3 observée dans des cultures primaires de mélanocytes uvéaux normaux, alors que les lignées des métastases en exprimaient seulement entre 2 et 4% (van Der Velden et al., 2003). La régulation négative de TIMP3 dans les tumeurs primaires proviendrait de la méthylation de son promoteur (van Der Velden et al., 2003). Une régulation négative de TIMP3 a d'ailleurs été observée dans les cancers du rein et du poumon (McElligott et al., 1997; Michael et al., 1999). Une perturbation des interactions entre les MMP et leurs inhibiteurs (TIMP) peut donner lieu à la dégradation de la membrane basale, favorisant ainsi l'invasion et la formation de métastases (Hofmann et al., 2000). Nous n'avons pas retrouvé cette protéine dans notre banque de soustraction, car nous nous sommes concentré seulement sur les gènes surexprimés ou spécifiques à la tumeur primaire et non aux MCN. Une surexpression du *migration inhibitory factor* (MIF) dans les lignées de métastases a également été remarquée. Le mélanome uvéal acquiert une protection contre les cellules tueuses naturelles grâce à la sécrétion de MIF lorsque les cellules ont quitté l'environnement oculaire immunoprivilégié (protection immunitaire spéciale utilisant au minimum les processus inflammatoires, davantage néfastes que bénéfiques à la vision) et, de cette façon, MIF peut contribuer à la dissémination des cellules de la tumeur primaire (Repp et al., 2000). Parmi les gènes exprimés de façon différentielle, il y avait aussi trois sous-unités d'intégrines : αE et $\beta 8$ qui étaient surexprimées et $\beta 4$ qui était sous-exprimée dans la lignée de tumeur primaire. Lors de nos analyses en cytométrie de flux, nous avons obtenu un résultat semblable pour la sous-unité $\beta 4$, puisque les deux lignées de tumeurs primaires n'exprimaient pas la sous-unité $\beta 4$ comparativement aux MCN et à la lignée hépatique H79.

En résumé, aucun des gènes que nous avons isolé à l'aide de la banque de soustraction n'est mentionné dans les sept études présentées plus haut. Seule la première étude a comparé la tumeur primaire à la cellule normale, mais cette article ne mentionne pas les gènes obtenus lors de cette étude, à part CYR61 et TF (Walker et al., 2002). La technique de criblage de micropuces d'ADNc permettant surtout d'identifier des gènes surexprimés ou sous-exprimés, il est difficile de comparer nos résultats avec les études utilisant cette technique, puisque nous avons conservé pour le séquençage seulement les clones spécifiques à la lignée TP31 et non les clones surexprimés ou sous-exprimés.

3.3 DÉTERMINATION DU PHÉNOTYPE DE LA LIGNÉE HÉPATIQUE H79 PAR IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE À L'AIDE DE MARQUEURS CELLULAIRES SPÉCIFIQUES

Avant d'utiliser la lignée hépatique H79 lors de la construction ultérieure d'une banque de soustraction « tumeur primaire (« lignée TP31) – métastase hépatique (lignée H79) » pour l'identification de gènes responsables du potentiel métastatique du mélanome uvéal, nous voulions nous assurer de l'origine mélanocytaire de la lignée H79. Des marqueurs cellulaires spécifiques aux cellules épithéliales (cytokératines), aux cellules stromales (vimentine), au mélanome (HMB-45) et aux cellules hépatiques (AFP) ont permis de déterminer le phénotype de la lignée hépatique H79 dérivée d'une métastase hépatique du mélanome uvéal.

Avant toute chose, il était important d'effectuer un contrôle positif avec chaque anticorps, afin de vérifier la spécificité du clone utilisé. Les différents types de cellules utilisées comme contrôles positifs et les résultats pour la lignée H79 sont énumérés dans le tableau 3.8.

Puisque les marquages des contrôles positifs ont fonctionné, nous avons pu valider les résultats négatifs obtenus avec la lignée H79. Des résultats positifs ont été obtenus avec l'anti-cytokératines (cytokératines 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11 et 18) pour l'EPR et la lignée

H79 (voir figure 3.35A). Le phénotype épithélioïde observé lors de la microscopie en contraste de phase (voir figure 3.1B) vient renforcer ce résultat.

TABLEAU 3.8
Détermination du phénotype de la lignée hépatique H79

Marqueurs cellulaires spécifiques	Contrôles positifs	Résultats pour H79
Anti-cytokératines	EPR	+
Anti-vimentine	MCN	+
Anti-HMB45	lignée TP31	-
Anti-AFP	lignée HepG2	-

Le phénotype épithélioïde pourrait provenir d'une interconversion phénotypique (Hendrix et al., 1998), un phénomène qui serait provoqué par la coexpression des cytokératines 8/18 (cellules épithéliales) et de la vimentine (cellules stromales) (Fuchs et Weber, 1994). Des résultats positifs ont d'ailleurs été obtenus avec l'anti-vimentine pour les MCN et la lignée H79 (voir figure 3.35B). La coexpression de ces deux types de filaments intermédiaires pourrait procurer aux cellules de phénotype épithélioïde les caractéristiques des deux types cellulaires. Ces nouvelles propriétés seraient responsables de l'augmentation du potentiel invasif et tumorigène démontré par les cellules épithélioïdes. Ainsi, les cellules dérivées de mélanome uvéal de type épithélioïde seraient plus agressives que celles provenant d'un mélanome de type fusiforme (McLean et al., 1983).

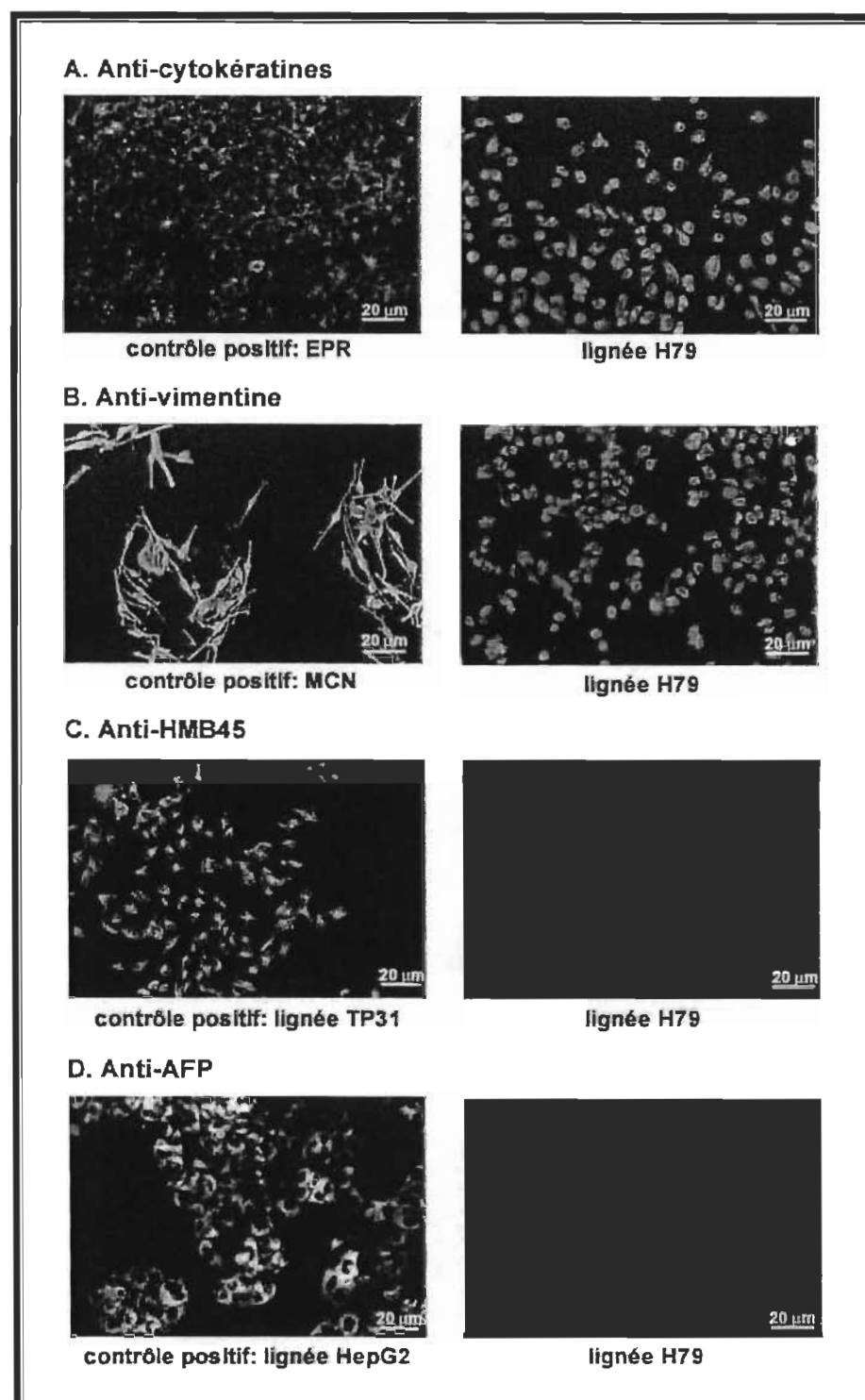


FIGURE 3.35 :Analyse du phénotype de la lignée hépatique H79 par immunofluorescence indirecte. (A) anti-cytokératines, (B) anti-vimentine, (C) anti-HMB45 et (D) anti-AFP.

L'anticorps anti-HMB45 a reconnu son antigène (la protéine gp100 qui est présente au niveau de la membrane des mélanosomes immatures) dans la lignée TP31, mais cet antigène était absent dans la lignée H79 (voir figure 3.35C). Les cellules de la lignée H79 ne possèdent donc pas l'antigène HMB45, contrairement à la majorité des cellules cancéreuses dérivées d'un mélanome uvéal. Bien que l'anticorps HMB45 est l'un des marqueurs les plus efficaces pour identifier les cellules cancéreuses du mélanome uvéal, il ne donne pas un résultat positif dans tous les cas : 93% des cas de tumeurs primaires et 91% des cas de métastases (Luyten et al., 1996). Nous n'avons donc pas pu confirmer l'origine mélanocytaire de cette tumeur hépatique à l'aide de ce marqueur.

L'anticorps anti-AFP a reconnu son antigène dans la lignée HepG2 dérivée d'un carcinome hépatocellulaire, mais cet antigène était absent dans la lignée H79 (voir figure 3.35D). La lignée H79 ne provient donc pas de la transformation maligne de cellules hépatiques.

CHAPITRE 4

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

4.1 RÉCAPITULATION DES RÉSULTATS

Premièrement, l'utilisation de la microscopie en contraste de phase et du cytomètre de flux ont permis de comparer la morphologie en culture des MCN, des lignées cancéreuses TP31 et SP8.0 (tumeurs primaires du mélanome uvéal) et de la lignée hépatique H79 (métastase hépatique du mélanome uvéal) et de caractériser leur profil d'expression des intégrines. Nous avons d'abord confirmé que les MCN étaient des cellules fusiformes, que la lignée cancéreuse TP31 était de phénotype mixte (cellules fusiformes et épithélioïdes) et que la lignée hépatique H79 était de phénotype épithélioïde. Ensuite, les mesures de cytométrie de flux ont permis de démontrer que les MCN exprimaient à leur surface les sous-unités d'intégrines $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$, $\beta 4$ et $\beta 5$, les lignées cancéreuses TP31 et SP8.0, les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$ et $\beta 5$, alors que la lignée hépatique H79 exprimait toutes les sous-unités d'intégrines à l'étude. Les résultats les plus significatifs étaient la présence exclusive des sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 3$ chez la lignée hépatique H79, l'absence de la sous-unité $\beta 4$ chez les lignées cancéreuses de tumeurs primaires SP8.0 et TP31 et la diminution de l'expression de la sous-unité $\beta 5$ chez les trois lignées cancéreuses comparativement aux MCN.

Ensuite, l'utilisation de la technique de banque de soustraction a permis de soustraire les populations d'ARNm des MCN de celles de la lignée cancéreuse TP31, afin d'amplifier les gènes qui étaient spécifiquement exprimés par la tumeur primaire (lignée TP31). Plusieurs étapes ont été nécessaires à l'obtention des clones spécifiques à la lignée TP31. D'abord, nous avons vérifié l'efficacité des deux soustractions en étudiant la différence entre les échantillons soustraits et non soustraits dans le nombre de cycles requis pour une amplification équivalente de l'actine. Il devait y avoir une différence de 5 à 15 cycles entre ces deux types de préparations pour confirmer l'efficacité de la soustraction; une différence de cinq cycles était présente correspondant

grossièrement à un enrichissement de l'ADNc par un facteur de vingt. Les transcrits obtenus de la banque de soustraction directe ont ensuite été clonés dans le vecteur *pGEM-T Easy* pour créer une librairie de clones candidats. À la suite de la sélection des colonies blanches, 480 colonies ont été repiquées et amplifiées par PCR pour vérifier la présence d'inserts. À cette étape, 316 des 480 clones, soit ceux contenant un seul insert, ont été conservés pour le criblage différentiel et la majorité des transcrits avaient des longueurs allant de 400 à 1000 pb. Le criblage différentiel des clones candidats spécifiques à la lignée TP31 a ensuite permis d'éliminer les faux positifs de la banque de soustraction avant le séquençage; 130 clones ont été retenus, puisqu'ils étaient spécifiques à la lignée TP31. L'analyse bioinformatique subséquente de 112 des 130 clones séquencés à l'aide des banques de données *NCBI*, *Ensembl* et *NEI Bank*, a permis de classer ces clones en trois catégories. La première catégorie de clones regroupait les protéines connues (29/112; 25,9%), la deuxième catégorie contenait les clones correspondant à des ESTs ou à des HTGS (50/112; 44,6%) et la dernière catégorie renfermait les clones inconnus dans les banques de données (33/112; 29,5%). Les 18 autres clones devront être séquencés de nouveau, car les séquences obtenues étaient ambiguës. La présence de quelques clones intéressants dans différents tissus normaux et lignées cancéreuses (clones correspondant à des ESTs ou à des HTGS et clones inconnus) a ensuite été vérifiée par amplification PCR. Parmi les cinq clones testés jusqu'à maintenant, seul le clone G2-44 (EST) est un candidat intéressant pour la mise au point d'un marqueur spécifique au mélanome uvéal, car ce transcrit était présent seulement dans la lignée cancéreuse HeLa (faiblement) et les lignées cancéreuses du mélanome uvéal (fortement). Les quatre autres clones analysés ont été mis de côté : le clone G2-8 parce qu'il était ubiquitaire, les clones G2-13 et G2-81 puisqu'ils étaient détectés dans les MCN (faux positifs) et le clone G2-15 car il était absent de tous les tissus normaux et lignées cancéreuses, même dans la lignée TP31 (amorces défectueuses). Nous devons répéter l'amplification de ce dernier clone avec de nouvelles amorces afin de démontrer s'il s'agit d'un candidat potentiel pour la mise au point d'un marqueur spécifique au mélanome uvéal.

Enfin, l'utilisation en immunofluorescence indirecte de marqueurs spécifiques aux cellules épithéliales (cytokératines), aux cellules stromales (vimentine), au mélanome (HMB45) et aux cellules cancéreuses hépatiques (AFP) a permis d'établir le phénotype épithélioïde de la lignée H79. Le résultat négatif obtenu avec l'anticorps anti-HMB45 nous empêche cependant de confirmer l'origine mélanocytaire de ces cellules de métastase hépatique. La présence de mélanosomes au sein de cette lignée devra être vérifiée par microscopie électronique.

4.2 CONCLUSIONS

L'utilisation de la microscopie en contraste de phase a permis de confirmer le phénotype des MCN et des lignées cancéreuses TP31 et H79. L'utilisation de ces trois types de cellules a permis de recréer en quelque sorte l'évolution du mélanome uvéal, de la cellule normale (MCN) à la métastase hépatique (lignée hépatique H79), en passant par la tumeur primaire (lignée cancéreuse TP31). Les mesures de cytométrie de flux ont permis, quant à elles, de faire ressortir certaines différences entre les MCN et les lignées cancéreuses de tumeurs primaires et de métastases du mélanome uvéal. D'abord, les sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 3$ étaient exprimées seulement par la lignée hépatique H79. Nous pouvons supposer que cette lignée exprimerait à nouveau ces sous-unités pour favoriser la colonisation du foie. L'absence de la sous-unité $\beta 4$ chez les lignées cancéreuses de tumeurs primaires SP8.0 et TP31 pourrait jouer un rôle dans le développement de la tumeur primaire et de ses métastases, puisque cette sous-unité était présente au départ chez la cellule normale (MCN), disparaissait ensuite chez les tumeurs primaires (lignées SP8.0 et TP31), puis réapparaissait chez la métastase hépatique. La diminution de l'expression de la sous-unité $\beta 5$ chez les trois lignées cancéreuses comparativement aux MCN pourrait également être impliquée dans le développement de la tumeur primaire et de ses métastases. Une chose est sûre : contrairement au mélanome cutané, la caractérisation du profil d'expression des intégrines chez les cas de mélanomes uvéaux n'est pas un bon indicateur du pouvoir invasif de la tumeur et du stade de la maladie.

À la fin de la soustraction, du clonage et du criblage différentiel, 130 clones sur les 480 colonies prélevées ont été jugés spécifiques à la lignée cancéreuse TP31. Le séquençage des clones spécifiques à la lignée TP31 et leur analyse bioinformatique a permis de déterminer l'identité et la localisation chromosomique des protéines connues qui étaient codées par ces clones (29/112), ainsi que la séquence et la localisation chromosomique des clones correspondant à des ESTs ou à des HTGS (50/112) et enfin la séquence des clones inconnus (33/112). Les 18 clones manquants devront être séquencés de nouveau pour déterminer leur identité. Concernant, les protéines connues, la plupart n'étaient pas des protéines dont la caractérisation était avancée. Plusieurs d'entre elles seraient impliquées dans la transformation maligne et le développement de métastases :

VRK1. Impliquée dans la phosphorylation du suppresseur de tumeur p53 (Barcia et al., 2002), dont le rôle est d'arrêter le cycle cellulaire pour permettre la réparation des dommages génétiques (Taylor et Stark, 2001). Pour jouer ce rôle, p53 doit se dissocier de son inhibiteur mdm2, un processus régulé par la phosphorylation. C'est VRK1 qui phosphoryle les molécules de p53, prévenant ainsi leur liaison à leurs inhibiteurs (Ryan et al., 2001).

PPP3CA. Impliquée dans la régulation de l'expression du ligand du récepteur Fas (Anel et al., 1994). Il a déjà été prouvé que les cellules du mélanome uvéal expriment le FasL et leur liaison aux hépatocytes riches en récepteur Fas induit l'apoptose (Repp et al., 2001).

MIFT. Impliquée dans la différenciation des mélanocytes (Tachibana et al., 1996). MIFT étant largement exprimée dans les cellules malignes d'origine mélanocytaire, c'est une expression différentielle des isoformes de MIFT qui influencerait le phénotype, la croissance et la transformation maligne (Selzer et al., 2002; Mouriaux et al., 2003). L'expression de MIFT représentant un bon indicateur de la différenciation mélanocytaire d'une cellule; l'absence de cette protéine chez les MCN pourrait s'expliquer par leur différenciation complète (Mouriaux et al., 2003).

TOP2A. Enzyme qui contrôle et altère les états topologiques de l'ADN (Miller et al., 1981). Elle induirait chez les tumeurs exprimant beaucoup de cette enzyme une résistance aux drogues, (Chikamori et al., 2003) et c'est souvent le cas dans le mélanome uvéal (Woll et al., 1999).

MC3R. Reconnaît le cœur de la séquence heptapeptidique des mélanocortines. Les mélanocortines sont des hormones aux diverses actions physiologiques, dont la régulation de la pigmentation des mélanocytes (De Wied et Jolles, 1982). Ce récepteur n'est pas exprimé dans les mélanocytes (Gantz et al., 1993).

MLH3. Impliquée dans la correction des erreurs chromosomiques associées à la réplication et à la recombinaison de l'ADN. Un dysfonctionnement du système de réparation des mauvais appariements donne lieu à un phénotype mutateur qui se manifeste par une instabilité des microsatellites (Wu et al., 2001). L'accumulation de changements génétiques est souvent associée avec une augmentation du potentiel de malignité des cellules cancéreuses (Lauffart et al., 2002).

RAMP. Joue un rôle dans la régulation de l'acide rétinoïque et dans la prolifération cellulaire de certaines cellules cancéreuses (Cheung et al., 2001).

Sous-unité d'intégrine $\alpha 6$. S'associe avec les sous-unités $\beta 1$ ou $\beta 4$ pour former des récepteurs liant la laminine. Une forte expression de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est associée avec un phénotype agressif et une capacité métastatique élevée (Falcioni et al., 1986). Cependant, son implication dans la progression tumorale diffère d'un cancer à l'autre, puisque des études sur l'expression de la sous-unité $\alpha 6$ dans différentes tumeurs démontrent soit une augmentation (Falcioni et al., 1986; Droz et al., 1994; Friedrichs et al., 1995; Lessey et al., 1995; Rabinovitz et al., 1995; Weinell et al., 1995; Putz et al., 1999), soit une disparition de cette sous-unité (D'Ardenne et al., 1991; Sager et al., 1993; Koukoulis et al., 1997). La présence de $\alpha 6$ dans le mélanome uvéal pourrait provenir de la présence dans la tumeur primaire d'un des patrons microvasculaires particuliers aux mélanomes ; ces patrons microvasculaires sont riches en laminine. Le patron

microvasculaire en boucle est d'ailleurs retrouvé dans 88% des tumeurs primaires de patients décédés des suites de métastases et il est également présent au niveau des métastases (Rummelt et al., 1994).

ch-TOG. Impliquée dans l'organisation des fuseaux achromatiques. Une surexpression de ch-TOG a été démontrée dans des tumeurs du colon et du foie, laissant supposer un rôle de ch-TOG dans la division cellulaire et la prolifération (Charrasse et al., 1995). La surexpression de ch-TOG dans les cellules cancéreuses et durant les premiers stades de l'embryogenèse comparativement aux tissus adultes (Gard et Kirschner, 1987) pourrait refléter une dé-différenciation des cellules tumorales par une régulation à la hausse de gènes normalement très exprimés durant le développement (Sell, 1993).

Caluménine. Protéine liant le Ca^{2+} impliquée dans certaines fonctions du RE nécessitant du Ca^{2+} , dont le repliement et le triage des protéines (Yabe et al., 1997). Certaines études ont démontré une fonction certaine de la caluménine dans des processus pathophysiologiques dont spécialement ceux associés à la transformation maligne (Chen et al., 1995; Liu et al., 1997).

La famille de protéines connues la plus représentée était celle ayant une fonction au sein du cycle cellulaire et de la prolifération (24,1%). L'interruption de l'état de dormance des mélanocytes uvéaux normaux lors du développement d'une tumeur expliquerait ce résultat. Parmi les clones correspondant à des ESTs ou à des HTGS, certains plus intéressants concordaient avec un seul EST retrouvé dans un seul tissu ou chromosome (en excluant les ESTs de la vision et de l'audition). Le clone G1-70, dont l'EST correspondant a été retrouvé dans un embryon et le clone G2-45 retrouvé dans les cellules souches mésenchymateuses (Peng et Huard, 2003) pourraient refléter une dé-différenciation des cellules tumorales de la lignée TP31. Le clone G4-91 présente également un intérêt, car le seul EST correspondant à ce transcrit a été cloné dans le foie, l'organe atteint dans 97% des cas de mélanomes uvéaux (Spencer, 1986). Parmi les clones correspondant à des ESTs ou à des HTGS, certains concordaient aussi avec des

ESTs de la vision et de l'audition (21/112; 18,8%). Plusieurs clones ont été retrouvés dans la banque d'ESTs d'œil foetal ce qui suggère une dé-différenciation des cellules de la lignée TP31, mais ces clones étaient également retrouvés dans d'autres tissus oculaires ou non oculaires adultes. D'autres clones ont été retrouvés dans la banque d'ESTs EPR/choroïde, mais ils correspondaient également à plusieurs ESTs oculaires ou non oculaires. Enfin, plusieurs clones concordaient avec des ESTs de cochlée, mais aucun n'était spécifique à celle-ci. Tous les clones codant pour des protéines connues ou correspondant à des ESTs ou à des HTGS ont ensuite été classés selon leur localisation chromosomique. Aucun clone n'a été localisé sur les chromosomes 5, 9, 12, 13, 18, 19, 21, Y et trois clones n'ont pu être associés à un chromosome. Les chromosomes 1 et 14 étaient les chromosomes auxquels ont été associés le plus de clones (13,9% chacun). Dans le mélanome uvéal, les anomalies les plus courantes sont la monosomie du chromosome 3 et les gains sur le bras q du chromosome 8, associées fortement avec une réduction de la survie du patient (Prescher et al., 1996; Sisley et al., 1997). Il y a également la délétion de la bande p21-23 du chromosome 1 et des anomalies du chromosome 6 qui sont associées à un meilleur pronostic (White et al., 1998; Aalto et al., 2001). Toutefois, aucune de ces anomalies ne semblait être présente dans la lignée TP31. Le tiers des clones correspondant à des transcrits inconnus, il sera intéressant de vérifier leur présence dans d'autres tissus normaux et lignées cancéreuses. À la suite d'amplifications PCR effectuées avec cinq clones intéressants, afin de vérifier leur présence dans d'autres tissus et lignées cancéreuses, seul le clone G2-44 serait un candidat intéressant pour la mise au point d'un marqueur spécifique au mélanome uvéal.

Enfin, l'utilisation en immunofluorescence indirecte de marqueurs spécifiques a permis d'établir le phénotype épithélioïde de la lignée H79. Le phénotype épithélioïde de la lignée H79 pourrait provenir d'une interconversion phénotypique (Hendrix et al., 1998). La coexpression des cytokératines 8/18 et de la vimentine pourrait procurer aux cellules de la lignée H79 les caractéristiques des deux types cellulaires et ces nouvelles propriétés seraient responsables de l'augmentation du potentiel invasif et tumorigène démontré par cette lignée (Hendrix et al., 1998). Nous n'avons pu cependant confirmer l'origine mélanocytaire de ces cellules de métastase hépatique du mélanome uvéal.

4.3 PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Il faudra d'abord refaire séquencer les 18 clones dont les séquences étaient imprécises, afin de les identifier. Il faudra également poursuivre l'amplification PCR de tous les clones correspondant à des ESTs ou à des HTGS, ainsi que les clones inconnus dans des tissus normaux et des lignées cancéreuses.

Au niveau des protéines connues, certaines précisions devront être apportées. La première concerne le facteur de transcription MIFT, dont une isoforme a été identifiée dans les transcrits spécifiques à la lignée TP31. Il faudrait vérifier de quelle isoforme il s'agit, en amplifiant par PCR la région N-terminale spécifique à chaque isoforme. Ensuite, les résultats contradictoires entre la banque de soustraction et la cytométrie de flux pour la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ devront être clarifiés. Une première vérification a été réalisée par amplification PCR de la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ avec l'ADNc des MCN et de la lignée cancéreuse TP31. Le résultat négatif pour les MCN semble confirmer celui de la banque de soustraction, mais un test d'adhésion à la laminine pourrait permettre de confirmer l'absence ou la présence de cette sous-unité chez les MCN.

En ce qui a trait aux clones déjà testés dans les tissus normaux et les lignées cancéreuses, il sera intéressant de caractériser la bande de 600 pb que l'on retrouvait seulement dans les MCN lors de l'amplification PCR du clone G2-13, en plus de refaire de nouvelles amorces pour le clone G2-15.

Concernant, le clone G2-44, il faudra vérifier la présence du transcrit dans des tissus oculaires normaux et d'autres lignées cancéreuses du mélanome uvéal et du cancer de l'estomac avant de confirmer sa forte expression exclusive au mélanome uvéal. Afin de s'assurer que ce transcrit n'est pas un artéfact de mise en culture, sa présence sera également vérifiée *in vivo*, en l'amplifiant par PCR dans des tumeurs de mélanome uvéal fraîches ou conservées dans la paraffine. Si ce transcrit est effectivement présent *in vivo* et spécifique au mélanome uvéal, il faudra caractériser la protéine codée par le gène

entier du clone G2-44, donc obtenir la séquence entière de l'ADNc. L'alignement des ESTs homologues à ce transcrit ne permettra pas de l'allonger, puisqu'un seul EST, plus court que notre fragment, correspondait au clone G2-44. Une autre option serait d'effectuer une recherche de séquences présentant une identité avec le clone G2-44, mais pour lesquelles aucune protéine n'a encore été attribuée. Ces séquences homologues, appelées HTGS, pourront être ensuite soumises à divers algorithmes de recherche, afin de déterminer les séquences codantes potentielles. Si cette approche ne fonctionne pas, nous pourrions utiliser la technique du *RACE* (*Rapid amplification of cDNA ends*), afin d'obtenir les extrémités 5' et 3' de notre transcrit. Ensuite, à l'aide d'algorithmes utilisés pour la traduction des séquences nucléotidiques en protéines, nous pourrions obtenir une séquence hypothétique pour le clone G2-44. Lorsque la protéine sera caractérisée, nous pourrions cribler une banque de sang de patients atteints du mélanome uvéal pour vérifier la présence de cette protéine dans le sang. D'autres gènes spécifiques au mélanome uvéal seront recherchés et caractérisés parmi les clones obtenus de la soustraction. Il serait intéressant de pousser l'étude jusqu'à la caractérisation des gènes qui sont sous-exprimés dans le mélanome uvéal.

Enfin, pour s'assurer de l'origine mélanocytaire de la lignée H79, nous effectuerons une analyse de coupes de la lignée H79 en microscopie électronique. Cette technique nous permettra de confirmer la présence de mélanosomes. Si la lignée H79 provient effectivement de la transformation d'un mélanocyte, elle sera utilisée lors de la construction ultérieure d'une banque de soustraction « tumeur primaire (lignée TP31) – métastase hépatique (lignée H79) », afin d'identifier des gènes responsables du potentiel métastatique du mélanome uvéal.

L'objectif ultime de ce projet de recherche demeure le développement d'un test de dépistage précoce pour le mélanome uvéal, afin d'augmenter les chances de survie des personnes atteintes. Pour l'instant, les méthodes de diagnostic ne permettent pas de détecter ce cancer avant sa dissémination.

RÉFÉRENCES

- Aalto, Y., Eriksson, L., Seregard, S., Larsson, O. et Knuutila, S. (2001). Concomitant loss of chromosome 3 and whole arm losses and gains of chromosome 1, 6, or 8 in metastasizing primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 313-7.
- Ah-Fat, F. G., Sharma, M. C. et Damato, B. E. (1998). Taping outpatient consultations: a survey of attitudes and responses of adult patients with ocular malignancy. *Eye* 12 (Pt 5), 789-91.
- Albelda, S. M., Mente, S. A., Elder, D. E., Stewart, R., Damjanovich, L., et al. (1990). Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res* 50, 6757-64.
- Albert, D. M., Niffenegger, A. S. et Willson, J. K. (1992). Treatment of metastatic uveal melanoma: review and recommendations. *Surv Ophthalmol* 36, 429-38.
- Amae, S., Fuse, N., Yasumoto, K., Sato, S., Yajima, I., et al. (1998). Identification of a novel isoform of microphthalmia-associated transcription factor that is enriched in retinal pigment epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 710-5.
- Anastassiou, G., Tschentscher, F., Zeschnigk, M. et Bornfeld, N. (2002). Cadherin expression in uveal melanoma. *Exp Eye Res* 74, 423-5.
- Anel, A., Buferne, M., Boyer, C., Schmitt-Verhulst, A. M. et Golstein, P. (1994). T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A. *Eur J Immunol* 24, 2469-76.
- Augsburger, J. J., Correa, Z. M., Freire, J. et Brady, L. W. (1998). Long-term survival in choroidal and ciliary body melanoma after enucleation versus plaque radiation therapy. *Ophthalmology* 105, 1670-8.
- Augsburger, J. J., Schneider, S., Freire, J. et Brady, L. W. (1999). Survival following enucleation versus plaque radiotherapy in statistically matched subgroups of patients with choroidal melanomas: results in patients treated between 1980 and 1987. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237, 558-67.
- Bai, J., Brody, J. R., Kadkol, S. S. et Pasternack, G. R. (2001). Tumor suppression and potentiation by manipulation of pp32 expression. *Oncogene* 20, 2153-60.
- Baldwin, C. T., Hoth, C. F., Macina, R. A. et Milunsky, A. (1995). Mutations in PAX3 that cause Waardenburg syndrome type I: ten new mutations and review of the literature. *Am J Med Genet* 58, 115-22.

- Barcia, R., Lopez-Borges, S., Vega, F. M. et Lazo, P. A. (2002). Kinetic properties of p53 phosphorylation by the human vaccinia-related kinase 1. *Arch Biochem Biophys* 399, 1-5.
- Barks, J. H., Thompson, F. H., Taetle, R., Yang, J. M., Stone, J. F., et al. (1997). Increased chromosome 20 copy number detected by fluorescence in situ hybridization (FISH) in malignant melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 19, 278-85.
- Barr, C. C., McLean, I. W. et Zimmerman, L. E. (1981). Uveal melanoma in children and adolescents. *Arch Ophthalmol* 99, 2133-6.
- Bauer, M. F., Sirrenberg, C., Neupert, W. et Brunner, M. (1996). Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell* 87, 33-41.
- Beliveau, A., Berube, M., Rousseau, A., Pelletier, G. et Guerin, S. L. (2000). Expression of integrin $\alpha 5 \beta 1$ and MMPs associated with epithelioid morphology and malignancy of uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 2363-72.
- Beliveau, A., Berube, M., Carrier, P., Mercier, C. et Guerin, S. L. (2001). Tumorigenicity of the mixed spindle-epithelioid SP6.5 and epithelioid TP17 uveal melanoma cell lines is differentially related to $\alpha 5 \beta 1$ integrin expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 3058-65.
- Bell, D. A. et DeMarini, D. M. (1991). Excessive cycling converts PCR products to random-length higher molecular weight fragments. *Nucleic Acids Res* 19, 5079.
- Berney, D. M., Shamash, J., Gaffney, J., Jordan, S. et Oliver, R. T. (2002). DNA topoisomerase I and II expression in drug resistant germ cell tumours. *Br J Cancer* 87, 624-9.
- Berson, F. G. (1993). Basic ophthalmology for medical students and primary care residents. San Francisco: American Academy of ophthalmology.
- Bittner, M., Meltzer, P., Chen, Y., Jiang, Y., Seftor, E., et al. (2000). Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 406, 536-40.
- Black, W. C. et Wiggins, C. (1985). Melanoma among southwestern American Indians. *Cancer* 55, 2899-902.
- Boissy, R. E. (1988). The melanocyte. Its structure, function, and subpopulations in skin, eyes, and hair. *Dermatol Clin* 6, 161-73.
- Bork, P., Doerks, T., Springer, T. A. et Snel, B. (1999). Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci* 24, 261-3.

- Brantley, M. A., Jr. et Harbour, J. W. (2000). Deregulation of the Rb and p53 pathways in uveal melanoma. *Am J Pathol* 157, 1795-801.
- Char, D. H., Kroll, S. M. et Castro, J. (1998). Ten-year follow-up of helium ion therapy for uveal melanoma. *Am J Ophthalmol* 125, 81-9.
- Charrasse, S., Mazel, M., Taviaux, S., Berta, P., Chow, T., et al. (1995). Characterization of the cDNA and pattern of expression of a new gene over-expressed in human hepatomas and colonic tumors. *Eur J Biochem* 234, 406-13.
- Charrasse, S., Coubes, P., Arrancibia, S. et Larroque, C. (1996). Expression of the tumor over-expressed ch-TOG gene in human and baboon brain. *Neurosci Lett* 212, 119-22.
- Charrasse, S., Schroeder, M., Gauthier-Rouviere, C., Ango, F., Cassimeris, L., et al. (1998). The TOGp protein is a new human microtubule-associated protein homologous to the Xenopus XMAP215. *J Cell Sci* 111 (Pt 10), 1371-83.
- Chen, J. J., Reid, C. E., Band, V. et Androphy, E. J. (1995). Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science* 269, 529-31.
- Chen, T. H., Brody, J. R., Romantsev, F. E., Yu, J. G., Kayler, A. E., et al. (1996). Structure of pp32, an acidic nuclear protein which inhibits oncogene-induced formation of transformed foci. *Mol Biol Cell* 7, 2045-56.
- Cheresh, D. A. et Mecham, R. P. (1994). Integrins molecular and biological responses to the extracellular matrix. San Diego: Editions Academic Press.
- Cheung, W. M., Chu, A. H., Chu, P. W. et Ip, N. Y. (2001). Cloning and expression of a novel nuclear matrix-associated protein that is regulated during the retinoic acid-induced neuronal differentiation. *J Biol Chem* 276, 17083-91.
- Chikamori, K., Grabowski, D. R., Kinter, M., Willard, B. B., Yadav, S., et al. (2003). Phosphorylation of serine 1106 in the catalytic domain of topoisomerase II alpha regulates enzymatic activity and drug sensitivity. *J Biol Chem* 278, 12696-702.
- Chomczynski, P. et Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-9.
- Chu, Y. W., Seftor, E. A., Romer, L. H. et Hendrix, M. J. (1996). Experimental coexpression of vimentin and keratin intermediate filaments in human melanoma cells augments motility. *Am J Pathol* 148, 63-9.
- Clarijs, R., Schalkwijk, L., Ruiter, D. J. et de Waal, R. M. (2001). Lack of lymphangiogenesis despite coexpression of VEGF-C and its receptor Flt-4 in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 1422-8.

- Clark, V. M. et Hall, M. O. (1986). RPE cell surface proteins in normal and dystrophic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27, 136-44.
- Colognato, H. et Yurchenco, P. D. (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* 218, 213-34.
- Cree, I. A. (2000). Cell cycle and melanoma--two different tumours from the same cell type. *J Pathol* 191, 112-4.
- D'Ardenne, A. J., Richman, P. I., Horton, M. A., McAulay, A. E. et Jordan, S. (1991). Co-ordinate expression of the alpha-6 integrin laminin receptor sub-unit and laminin in breast cancer. *J Pathol* 165, 213-20.
- Daniels, K. J., Boldt, H. C., Martin, J. A., Gardner, L. M., Meyer, M., et al. (1996). Expression of type VI collagen in uveal melanoma: its role in pattern formation and tumor progression. *Lab Invest* 75, 55-66.
- De Wied, D. et Jolles, J. (1982). Neuropeptides derived from pro-opiocortin: behavioral, physiological, and neurochemical effects. *Physiol Rev* 62, 976-1059.
- De Wied, D. et Croiset, G. (1991). Stress modulation of learning and memory processes. *Methods Achiev Exp Pathol* 15, 167-99.
- Denda, S., Reichardt, L. F. et Muller, U. (1998). Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin alpha8 beta1 and potential roles for this integrin-ligand interaction in kidney morphogenesis. *Mol Biol Cell* 9, 1425-35.
- Di Fiore, M. S. H. (1988). Atlas of normal histology. Philadelphia: Lea and Febiger.
- Diatchenko, L., Lukyanov, S., Lau, Y. F. et Siebert, P. D. (1999). Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 303, 349-80.
- Dithmar, S., Diaz, C. E. et Grossniklaus, H. E. (2000). Intraocular melanoma spread to regional lymph nodes: report of two cases. *Retina* 20, 76-9.
- Droz, D., Patey, N., Paraf, F., Chretien, Y. et Gogusev, J. (1994). Composition of extracellular matrix and distribution of cell adhesion molecules in renal cell tumors. *Lab Invest* 71, 710-8.
- Drubin, D. G. et Nelson, W. J. (1996). Origins of cell polarity. *Cell* 84, 335-44.
- Edgington, T. S., Mackman, N., Brand, K. et Ruf, W. (1991). The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost* 66, 67-79.
- Egan, K. M., Seddon, J. M., Glynn, R. J., Gragoudas, E. S. et Albert, D. M. (1988). Epidemiologic aspects of uveal melanoma. *Surv Ophthalmol* 32, 239-51.

- Einhorn, L. H., Burgess, M. A. et Gottlieb, J. A. (1974). Metastatic patterns of choroidal melanoma. *Cancer* 34, 1001-4.
- Elner, S. G. et Elner, V. M. (1996). The integrin superfamily and the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 696-701.
- Elshaw, S. R., Sisley, K., Cross, N., Murray, A. K., MacNeil, S. M., et al. (2001). A comparison of ocular melanocyte and uveal melanoma cell invasion and the implication of $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 6\beta 1$ integrins. *Br J Ophthalmol* 85, 732-8.
- Eskelin, S., Pyrhonen, S., Summanen, P., Prause, J. U. et Kivela, T. (1999). Screening for metastatic malignant melanoma of the uvea revisited. *Cancer* 85, 1151-9.
- Eskelin, S., Pyrhonen, S., Summanen, P., Hahka-Kemppinen, M. et Kivela, T. (2000). Tumor doubling times in metastatic malignant melanoma of the uvea: tumor progression before and after treatment. *Ophthalmology* 107, 1443-9.
- Falcioni, R., Kennel, S. J., Giacomini, P., Zupi, G. et Sacchi, A. (1986). Expression of tumor antigen correlated with metastatic potential of Lewis lung carcinoma and B16 melanoma clones in mice. *Cancer Res* 46, 5772-8.
- Fan, W., Boston, B. A., Kesterson, R. A., Hruby, V. J. et Cone, R. D. (1997). Role of melanocortineric neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385, 165-8.
- Feng, J. D., Dao, T. et Lipton, J. M. (1987). Effects of preoptic microinjections of alpha-MSH on fever and normal temperature control in rabbits. *Brain Res Bull* 18, 473-7.
- Ffrench-Constant, C. (1995). Alternative splicing of fibronectin--many different proteins but few different functions. *Exp Cell Res* 221, 261-71.
- Finger, P. T. (1997). Radiation therapy for choroidal melanoma. *Surv Ophthalmol* 42, 215-32.
- Folberg, R., Pe'er, J., Gruman, L. M., Woolson, R. F., Jeng, G., et al. (1992). The morphologic characteristics of tumor blood vessels as a marker of tumor progression in primary human uveal melanoma: a matched case-control study. *Hum Pathol* 23, 1298-305.
- Folberg, R., Rummelt, V., Parys-Van Ginderdeuren, R., Hwang, T., Woolson, R. F., et al. (1993). The prognostic value of tumor blood vessel morphology in primary uveal melanoma. *Ophthalmology* 100, 1389-98.
- Freshney, R. (1992). Culture of epithelial cells. New-York: Wiley-Liss.

- Friedrichs, K., Ruiz, P., Franke, F., Gille, I., Terpe, H. J., et al. (1995). High expression level of alpha 6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. *Cancer Res* 55, 901-6.
- Frisch, S. M. et Ruoslahti, E. (1997). Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 9, 701-6.
- Fuchs, E. et Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 63, 345-82.
- Fuchs, U., Kivela, T., Summanen, P., Immonen, I. et Tarkkanen, A. (1992). An immunohistochemical and prognostic analysis of cytokeratin expression in malignant uveal melanoma. *Am J Pathol* 141, 169-81.
- Fuse, N., Yasumoto, K., Suzuki, H., Takahashi, K. et Shibahara, S. (1996). Identification of a melanocyte-type promoter of the microphthalmia-associated transcription factor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 219, 702-7.
- Fuse, N., Yasumoto, K., Takeda, K., Amae, S., Yoshizawa, M., et al. (1999). Molecular cloning of cDNA encoding a novel microphthalmia-associated transcription factor isoform with a distinct amino-terminus. *J Biochem (Tokyo)* 126, 1043-51.
- Gantz, I., Konda, Y., Tashiro, T., Shimoto, Y., Miwa, H., et al. (1993). Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem* 268, 8246-50.
- Gard, D. L. et Kirschner, M. W. (1987). A microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that specifically promotes assembly at the plus-end. *J Cell Biol* 105, 2203-15.
- Gebhardt, R. et Williams, G. M. (1995). Glutamine synthetase and hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 16, 1673-81.
- Giancotti, F. G. et Mainiero, F. (1994). Integrin-mediated adhesion and signaling in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1198, 47-64.
- Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W. G. et Quaranta, V. (1997). Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* 277, 225-8.
- Goldschild, M. et Baudouin, C. (1997). [Role of integrins in ocular physiology and diseases]. *J Fr Ophtalmol* 20, 311-25.
- Goodson, H. V., Valetti, C. et Kreis, T. E. (1997). Motors and membrane traffic. *Curr Opin Cell Biol* 9, 18-28.
- Guenel, P. L., Laforest, D., Cyr, D., Fevotte, J., Sabroe, S., et al. (2002). Facteurs de risques professionnels, rayonnements ultraviolets et mélanome oculaire. *Cahiers de notes documentaires hygiène et sécurité du travail* 189, 7-15.

- Guldberg, P., thor Straten, P., Birck, A., Ahrenkiel, V., Kirkin, A. F., et al. (1997). Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res* 57, 3660-3.
- Gutman, M., Inbar, M., Klausner, J. M. et Chaitchik, S. (1993). Malignant melanoma in different ethnic groups in Israel. Incidence and biologic behavior. *Cancer* 71, 2746-50.
- Hammer, H., Olah, J. et Toth-Molnar, E. (1996). Dysplastic nevi are a risk factor for uveal melanoma. *Eur J Ophthalmol* 6, 472-4.
- Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Eckes, M. D., Winters, A. L., Leong, S. P., et al. (1990). Effect of interferon-gamma on the expression of HLA-DR by human melanoma cells of varying metastatic potential. *Pigment Cell Res* 3, 162-7.
- Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Seftor, R. E., Gardner, L. M., Boldt, H. C., et al. (1998). Biologic determinants of uveal melanoma metastatic phenotype: role of intermediate filaments as predictive markers. *Lab Invest* 78, 153-63.
- Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Hess, A. R. et Seftor, R. E. (2003). Molecular plasticity of human melanoma cells. *Oncogene* 22, 3070-5.
- Hofmann, U. B., Westphal, J. R., Van Muijen, G. N. et Ruiter, D. J. (2000). Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol* 115, 337-44.
- Hogan, M. J., Alvaro, J. A. et Weddell, J. E. (1971). Histology of the human eye. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Hogg, N., Stewart, M. P., Scarth, S. L., Newton, R., Shaw, J. M., et al. (1999). A novel leukocyte adhesion deficiency caused by expressed but nonfunctional beta2 integrins Mac-1 and LFA-1. *J Clin Invest* 103, 97-106.
- Holly, E. A., Aston, D. A., Char, D. H., Kristiansen, J. J. et Ahn, D. K. (1990). Uveal melanoma in relation to ultraviolet light exposure and host factors. *Cancer Res* 50, 5773-7.
- Hood, J. D. et Cheresch, D. A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2, 91-100.
- Horsman, D. E. et White, V. A. (1993). Cytogenetic analysis of uveal melanoma. Consistent occurrence of monosomy 3 and trisomy 8q. *Cancer* 71, 811-9.
- Horsthemke, B., Prescher, G., Bornfeld, N. et Becher, R. (1992). Loss of chromosome 3 alleles and multiplication of chromosome 8 alleles in uveal melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 4, 217-21.

- Hsu, M. Y., Wheelock, M. J., Johnson, K. R. et Herlyn, M. (1996). Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1, 188-94.
- Hu, D. N., McCormick, S. A., Ritch, R. et Pelton-Henrion, K. (1993a). Studies of human uveal melanocytes in vitro: isolation, purification and cultivation of human uveal melanocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 2210-9.
- Hu, D. N., McCormick, S. A. et Ritch, R. (1993b). Studies of human uveal melanocytes in vitro: growth regulation of cultured human uveal melanocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 2220-7.
- Hu, Z. et Garen, A. (2001). Targeting tissue factor on tumor vascular endothelial cells and tumor cells for immunotherapy in mouse models of prostatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12180-5.
- Hudson, H. L., Valluri, S. et Rao, N. A. (1994). Choroidal melanomas in Hispanic patients. *Am J Ophthalmol* 118, 57-62.
- Humphries, M. J. (1993). Fibronectin and cancer: rationales for the use of antiadhesives in cancer treatment. *Semin Cancer Biol* 4, 293-9.
- Humphries, M. J. (2000). Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 28, 311-39.
- Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.
- Iwamoto, S., Burrows, R. C., Kalina, R. E., George, D., Boehm, M., et al. (2002). Immunophenotypic differences between uveal and cutaneous melanomas. *Arch Ophthalmol* 120, 466-70.
- Jensen, O. A. (1963). Malignant Melanomas of the Uvea in Denmark 1943-1952. A Clinical, Histopathological, and Prognostic Study. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 43, SUPPL 75:1-220.
- Jiang, W. G. (1998). Cell adhesion molecules in the formation of liver metastasis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 5, 375-82.
- Johansson, B., Mertens, F. et Mitelman, F. (1996). Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities--balanced rearrangements vs. genomic imbalances? *Genes Chromosomes Cancer* 16, 155-63.
- Kadkol, S. S., Brody, J. R., Pevsner, J., Bai, J. et Pasternack, G. R. (1999). Modulation of oncogenic potential by alternative gene use in human prostate cancer. *Nat Med* 5, 275-9.

- Kadkol, S. S., El Naga, G. A., Brody, J. R., Bai, J., Gusev, Y., et al. (2001). Expression of pp32 gene family members in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 68, 65-73.
- Kamata, T., Tieu, K. K., Irie, A., Springer, T. A. et Takada, Y. (2001). Amino acid residues in the alpha IIb subunit that are critical for ligand binding to integrin alpha IIbbeta 3 are clustered in the beta-propeller model. *J Biol Chem* 276, 44275-83.
- Knutti, D. et Kralli, A. (2001). PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrinol Metab* 12, 360-5.
- Koshikawa, N., Giannelli, G., Cirulli, V., Miyazaki, K. et Quaranta, V. (2000). Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol* 148, 615-24.
- Koukoulis, G. K., Warren, W. H., Virtanen, I. et Gould, V. E. (1997). Immunolocalization of integrins in the normal lung and in pulmonary carcinomas. *Hum Pathol* 28, 1018-25.
- Larouche, N., Larouche, K., Beliveau, A., Leclerc, S., Salesse, C., et al. (1998). Transcriptional regulation of the alpha 4 integrin subunit gene in the metastatic spread of uveal melanoma. *Anticancer Res* 18, 3539-47.
- Larsson, B. S. (1993). Interaction between chemicals and melanin. *Pigment Cell Res* 6, 127-33.
- Lauffart, B., Howell, S. J., Tasch, J. E., Cowell, J. K. et Still, I. H. (2002). Interaction of the transforming acidic coiled-coil 1 (TACC1) protein with ch-TOG and GAS41/NuBI1 suggests multiple TACC1-containing protein complexes in human cells. *Biochem J* 363, 195-200.
- Lazaris, A. C., Kavantzias, N. G., Zorzos, H. S., Tsavaris, N. V. et Davaris, P. S. (2002). Markers of drug resistance in relapsing colon cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 128, 114-8.
- Le Moigne, A. et Foucrier, J. (2001). Biologie du développement. Paris: Dunod.
- Lee, J. O., Bankston, L. A., Arnaout, M. A. et Liddington, R. C. (1995a). Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure* 3, 1333-40.
- Lee, J. O., Rieu, P., Arnaout, M. A. et Liddington, R. (1995b). Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* 80, 631-8.
- Lessey, B. A., Albelda, S., Buck, C. A., Castelbaum, A. J., Yeh, I., et al. (1995). Distribution of integrin cell adhesion molecules in endometrial cancer. *Am J Pathol* 146, 717-26.

- Leyvraz, S., Spataro, V., Bauer, J., Pampallona, S., Salmon, R., et al. (1997). Treatment of ocular melanoma metastatic to the liver by hepatic arterial chemotherapy. *J Clin Oncol* 15, 2589-95.
- Li, S. J., Varga, K., Archer, P., Hruby, V. J., Sharma, S. D., et al. (1996). Melanocortin antagonists define two distinct pathways of cardiovascular control by alpha- and gamma-melanocyte-stimulating hormones. *J Neurosci* 16, 5182-8.
- Li, W., Gragoudas, E. S. et Egan, K. M. (2000). Metastatic melanoma death rates by anatomic site after proton beam irradiation for uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 118, 1066-70.
- Liu, D., Huang, C. L., Kameyama, K., Hayashi, E., Yamauchi, A., et al. (2002). Topoisomerase IIalpha gene expression is regulated by the p53 tumor suppressor gene in nonsmall cell lung carcinoma patients. *Cancer* 94, 2239-47.
- Liu, Z., Brattain, M. G. et Appert, H. (1997). Differential display of reticulocalbin in the highly invasive cell line, MDA-MB-435, versus the poorly invasive cell line, MCF-7. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 283-9.
- Lu, C., Shimaoka, M., Ferzly, M., Oxvig, C., Takagi, J., et al. (2001). An isolated, surface-expressed I domain of the integrin alphaLbeta2 is sufficient for strong adhesive function when locked in the open conformation with a disulfide bond. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2387-92.
- Luyten, G. P., Mooy, C. M., Post, J., Jensen, O. A., Luider, T. M., et al. (1996). Metastatic uveal melanoma. A morphologic and immunohistochemical analysis. *Cancer* 78, 1967-71.
- Malinda, K. M. et Kleinman, H. K. (1996). The laminins. *Int J Biochem Cell Biol* 28, 957-9.
- Malinda, K. M., Nomizu, M., Chung, M., Delgado, M., Kuratomi, Y., et al. (1999). Identification of laminin alpha1 and beta1 chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation, and aortic sprouting. *Faseb J* 13, 53-62.
- Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M., et al. (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 155, 739-52.
- Marieb, E. N. (1992). Anatomie et physiologie humaines. Saint-Laurent: Éditions du Renouveau Pédagogique.
- Martinez-Hernandez, A. (1984). The hepatic extracellular matrix. I. Electron immunohistochemical studies in normal rat liver. *Lab Invest* 51, 57-74.

- Massaro-Giordano, M., Baldi, G., De Luca, A., Baldi, A. et Giordano, A. (1999). Differential expression of the retinoblastoma gene family members in choroidal melanoma: prognostic significance. *Clin Cancer Res* 5, 1455-8.
- Mazzanti, C. M., Bergen, A., Enoch, M. A., Micheni, S. et Goldman, D. (1996). Identification of a Ser857-Asn857 substitution in DRK1 (KCNB1), population frequencies and lack of association to the low voltage alpha EEG trait. *Hum Genet* 98, 134-7.
- McCarthy, M. J., Crowther, M., Bell, P. R. et Brindle, N. P. (1998). The endothelial receptor tyrosine kinase tie-1 is upregulated by hypoxia and vascular endothelial growth factor. *FEBS Lett* 423, 334-8.
- McElligott, A. M., Baker, A. H. et McGlynn, H. (1997). Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase regulation of the invasive potential of a metastatic renal cell line. *Biochem Soc Trans* 25, 147S.
- Mckee, P. H. (1989). Pathology of the skin. Philadelphia: J. B. Lippincott Company.
- McLean, I. W., Foster, W. D. et Zimmerman, L. E. (1982). Uveal melanoma: location, size, cell type, and enucleation as risk factors in metastasis. *Hum Pathol* 13, 123-32.
- McLean, I. W., Foster, W. D., Zimmerman, L. E. et Gamel, J. W. (1983). Modifications of Callender's classification of uveal melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology. *Am J Ophthalmol* 96, 502-9.
- McLean, I. W. (1993). The biology of haematogenous metastasis in human uveal malignant melanoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 422, 433-7.
- McLean, M. J., Foster, W. D. et Zimmerman, L. E. (1977). Prognostic factors in small malignant melanomas of choroid and ciliary body. *Arch Ophthalmol* 95, 48-58.
- Mertens, F., Mandahl, N., Mitelman, F. et Heim, S. (1994). Cytogenetic analysis in the examination of solid tumors in children. *Pediatr Hematol Oncol* 11, 361-77.
- Michael, M., Babic, B., Khokha, R., Tsao, M., Ho, J., et al. (1999). Expression and prognostic significance of metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 17, 1802-8.
- Millan, J., de Marco, M. C., Qaidi, M., Batista, A., Martin-Belmonte, F., et al. (2003). Isolation of lipid raft-associated proteolipids. *Methods Mol Biol* 228, 223-30.
- Miller, K. G., Liu, L. F. et Englund, P. T. (1981). A homogeneous type II DNA topoisomerase from HeLa cell nuclei. *J Biol Chem* 256, 9334-9.
- Mooy, C. M. et De Jong, P. T. (1996). Prognostic parameters in uveal melanoma: a review. *Surv Ophthalmol* 41, 215-28.

- Morris, P., Shaman, J., Attaya, M., Amaya, M., Goodman, S., et al. (1994). An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature* 368, 551-4.
- Mountjoy, K. G., Robbins, L. S., Mortrud, M. T. et Cone, R. D. (1992). The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 257, 1248-51.
- Mouriaux, F., Vincent, S., Kherrouche, Z., Maurage, C. A., Planque, N., et al. (2003). Microphthalmia transcription factor analysis in posterior uveal melanomas. *Exp Eye Res* 76, 653-61.
- Natali, P. G., Nicotra, M. R., Cavaliere, R., Giannarelli, D. et Bigotti, A. (1991). Tumor progression in human malignant melanoma is associated with changes in alpha 6/beta 1 laminin receptor. *Int J Cancer* 49, 168-72.
- Naus, N. C., Zuidervaart, W., Rayman, N., Slater, R., van Drunen, E., et al. (2000). Mutation analysis of the PTEN gene in uveal melanoma cell lines. *Int J Cancer* 87, 151-3.
- Naus, N. C., van Drunen, E., de Klein, A., Luyten, G. P., Paridaens, D. A., et al. (2001). Characterization of complex chromosomal abnormalities in uveal melanoma by fluorescence in situ hybridization, spectral karyotyping, and comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 30, 267-73.
- Nezu, J., Oku, A., Jones, M. H. et Shimane, M. (1997). Identification of two novel human putative serine/threonine kinases, VRK1 and VRK2, with structural similarity to vaccinia virus B1R kinase. *Genomics* 45, 327-31.
- O'Brien, T. P., Yang, G. P., Sanders, L. et Lau, L. F. (1990). Expression of *cyr61*, a growth factor-inducible immediate-early gene. *Mol Cell Biol* 10, 3569-77.
- Oegema, K., Savoian, M. S., Mitchison, T. J. et Field, C. M. (2000). Functional analysis of a human homologue of the *Drosophila* actin binding protein anillin suggests a role in cytokinesis. *J Cell Biol* 150, 539-52.
- Olinsky, S., Loop, B. T., DeKosky, A., Ripepi, B., Weng, W., et al. (1996). Chromosomal mapping of the human M6 genes. *Genomics* 33, 532-6.
- Pasca di Magliano, M., Di Lauro, R. et Zannini, M. (2000). Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13144-9.
- Peng, H. et Huard, J. (2003). Stem cells in the treatment of muscle and connective tissue diseases. *Curr Opin Pharmacol* 3, 329-33.
- Pesole, G., Bozzetti, M. P., Lanave, C., Preparata, G. et Saccone, C. (1991). Glutamine synthetase gene evolution: a good molecular clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 522-6.

- Pfeffer, B. A. (1991). Improved methodology for cell culture of human and monkey retinal pigment epithelium. *Progress in Retinal Research* 10, 251-91.
- Platz, A., Ringborg, U. et Hansson, J. (2000). Hereditary cutaneous melanoma. *Semin Cancer Biol* 10, 319-26.
- Ponting, C. P., Schultz, J., Copley, R. R., Andrade, M. A. et Bork, P. (2000). Evolution of domain families. *Adv Protein Chem* 54, 185-244.
- Prescher, G., Bornfeld, N. et Becher, R. (1990). Nonrandom chromosomal abnormalities in primary uveal melanoma. *J Natl Cancer Inst* 82, 1765-9.
- Prescher, G., Bornfeld, N., Friedrichs, W., Seeber, S. et Becher, R. (1995). Cytogenetics of twelve cases of uveal melanoma and patterns of nonrandom anomalies and isochromosome formation. *Cancer Genet Cytogenet* 80, 40-6.
- Prescher, G., Bornfeld, N., Hirche, H., Horsthemke, B., Jockel, K. H., et al. (1996). Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet* 347, 1222-5.
- Putz, E., Witter, K., Offner, S., Stosiek, P., Zippelius, A., et al. (1999). Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res* 59, 241-8.
- Pyrhonen, S., Hahka-Kemppinen, M. et Muhonen, T. (1992). A promising interferon plus four-drug chemotherapy regimen for metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 10, 1919-26.
- Pyrhonen, S. (1998). The treatment of metastatic uveal melanoma. *Eur J Cancer* 34 Suppl 3, S27-30.
- Qian, F., Vaux, D. L. et Weissman, I. L. (1994). Expression of the integrin alpha 4 beta 1 on melanoma cells can inhibit the invasive stage of metastasis formation. *Cell* 77, 335-47.
- Rabinovitz, I., Nagle, R. B. et Cress, A. E. (1995). Integrin alpha 6 expression in human prostate carcinoma cells is associated with a migratory and invasive phenotype in vitro and in vivo. *Clin Exp Metastasis* 13, 481-91.
- Regan, S., Judge, H. E., Gragoudas, E. S. et Egan, K. M. (1999). Iris color as a prognostic factor in ocular melanoma. *Arch Ophthalmol* 117, 811-4.
- Repp, A. C., Mayhew, E. S., Apte, S. et Niederkorn, J. Y. (2000). Human uveal melanoma cells produce macrophage migration-inhibitory factor to prevent lysis by NK cells. *J Immunol* 165, 710-5.

- Repp, A. C., Mayhew, E. S., Howard, K., Alizadeh, H. et Niederkorn, J. Y. (2001). Role of fas ligand in uveal melanoma-induced liver damage. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239, 752-8.
- Robertson, G. P., Herbst, R. A., Nagane, M., Huang, H. J. et Cavenee, W. K. (1999). The chromosome 10 monosomy common in human melanomas results from loss of two separate tumor suppressor loci. *Cancer Res* 59, 3596-601.
- Rohrbach, J. M., Wild, M., Riedinger, C., Kreissig, I. et Thiel, H. J. (1994). Premetastatic uveal melanoma cells do not express laminin receptors. *Ger J Ophthalmol* 3, 144-7.
- Rummelt, V., Folberg, R., Rummelt, C., Gruman, L. M., Hwang, T., et al. (1994). Microcirculation architecture of melanocytic nevi and malignant melanomas of the ciliary body and choroid. A comparative histopathologic and ultrastructural study. *Ophthalmology* 101, 718-27.
- Rummelt, V., Folberg, R., Woolson, R. F., Hwang, T. et Pe'er, J. (1995). Relation between the microcirculation architecture and the aggressive behavior of ciliary body melanomas. *Ophthalmology* 102, 844-51.
- Ryan, K. M., Phillips, A. C. et Vousden, K. H. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 13, 332-7.
- Sager, R., Anisowicz, A., Neveu, M., Liang, P. et Sotiropoulou, G. (1993). Identification by differential display of alpha 6 integrin as a candidate tumor suppressor gene. *Faseb J* 7, 964-70.
- Sanders, D. S., Blessing, K., Hassan, G. A., Bruton, R., Marsden, J. R., et al. (1999). Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours. *Mol Pathol* 52, 151-7.
- Scarpulla, R. C. (2002). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1576, 1-14.
- Seddon, J. M., Albert, D. M., Lavin, P. T. et Robinson, N. (1983). A prognostic factor study of disease-free interval and survival following enucleation for uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 101, 1894-9.
- Seddon, J. M., Gragoudas, E. S., Albert, D. M., Hsieh, C. C., Polivogianis, L., et al. (1985). Comparison of survival rates for patients with uveal melanoma after treatment with proton beam irradiation or enucleation. *Am J Ophthalmol* 99, 282-90.
- Seftor, E. A., Meltzer, P. S., Kirschmann, D. A., Pe'er, J., Maniotis, A. J., et al. (2002). Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 19, 233-46.

- Seftor, R. E., Seftor, E. A., Koshikawa, N., Meltzer, P. S., Gardner, L. M., et al. (2001). Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res* 61, 6322-7.
- Seitz, D. P., Pasha, M. K., Singh, B., Chu, A. et Sharma, R. K. (2002). Localization and characterization of calcineurin in bovine eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 15-21.
- Sell, S. (1993). Cellular origin of cancer: dedifferentiation or stem cell maturation arrest? *Environ Health Perspect* 101 Suppl 5, 15-26.
- Selzer, E., Wacheck, V., Lucas, T., Heere-Ress, E., Wu, M., et al. (2002). The melanocyte-specific isoform of the microphthalmia transcription factor affects the phenotype of human melanoma. *Cancer Res* 62, 2098-103.
- Seregard, S. (1999). Long-term survival after ruthenium plaque radiotherapy for uveal melanoma. A meta-analysis of studies including 1,066 patients. *Acta Ophthalmol Scand* 77, 414-7.
- Shammas, H. F. et Blodi, F. C. (1977). Prognostic factors in choroidal and ciliary body melanomas. *Arch Ophthalmol* 95, 63-9.
- Shields, C. L., Shields, J. A., Materin, M., Gershenbaum, E., Singh, A. D., et al. (2001). Iris melanoma: risk factors for metastasis in 169 consecutive patients. *Ophthalmology* 108, 172-8.
- Shields, J. A., Shields, C. L. et Donoso, L. A. (1991). Management of posterior uveal melanoma. *Surv Ophthalmol* 36, 161-95.
- Shields, J. A. et Shields, C. L. (1992). Intraocular tumors, an atlas and textbook. Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- Shields, J. A., Shields, C. L., De Potter, P. et Singh, A. D. (1996). Diagnosis and treatment of uveal melanoma. *Semin Oncol* 23, 763-7.
- Shimaoka, M., Takagi, J. et Springer, T. A. (2002). Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31, 485-516.
- Singh, A. D., Croce, C. M., Wary, K. K., Shields, J. A., Donoso, L. A., et al. (1996a). Familial uveal melanoma: absence of germline mutations involving the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene (p16). *Ophthalmic Genet* 17, 39-40.
- Singh, A. D., Shields, C. L., De Potter, P., Shields, J. A., Trock, B., et al. (1996b). Familial uveal melanoma. Clinical observations on 56 patients. *Arch Ophthalmol* 114, 392-9.

- Singh, A. D., De Potter, P., Fijal, B. A., Shields, C. L., Shields, J. A., et al. (1998). Lifetime prevalence of uveal melanoma in white patients with oculo(dermal) melanocytosis. *Ophthalmology* 105, 195-8.
- Singh, A. D., Shields, C. L., Shields, J. A. et Sato, T. (2000). Uveal melanoma in young patients. *Arch Ophthalmol* 118, 918-23.
- Sisley, K., Cottam, D. W., Rennie, I. G., Parsons, M. A., Potter, A. M., et al. (1992). Non-random abnormalities of chromosomes 3, 6, and 8 associated with posterior uveal melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 5, 197-200.
- Sisley, K., Rennie, I. G., Parsons, M. A., Jacques, R., Hammond, D. W., et al. (1997). Abnormalities of chromosomes 3 and 8 in posterior uveal melanoma correlate with prognosis. *Genes Chromosomes Cancer* 19, 22-8.
- Sisley, K., Parsons, M. A., Garnham, J., Potter, A. M., Curtis, D., et al. (2000). Association of specific chromosome alterations with tumour phenotype in posterior uveal melanoma. *Br J Cancer* 82, 330-8.
- Smith, E. M., Hughes, T. K., Jr., Hashemi, F. et Stefano, G. B. (1992). Immunosuppressive effects of corticotropin and melanotropin and their possible significance in human immunodeficiency virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 782-6.
- Spencer, W. H. (1986). Ophthalmic pathology, an atlas and textbook. Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- Springer, T. A. (1997). Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 65-72.
- Steel, D. M. et Whitehead, A. S. (1994). The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 15, 81-8.
- Stevens, A. et Lowe, J. (1997). Histologie humaine. Paris: De Boeck & Larcier.
- Stroeken, P. J., van Rijthoven, E. A., van der Valk, M. A. et Roos, E. (1998). Targeted disruption of the beta1 integrin gene in a lymphoma cell line greatly reduces metastatic capacity. *Cancer Res* 58, 1569-77.
- Tachibana, M., Takeda, K., Nobukuni, Y., Urabe, K., Long, J. E., et al. (1996). Ectopic expression of MITF, a gene for Waardenburg syndrome type 2, converts fibroblasts to cells with melanocyte characteristics. *Nat Genet* 14, 50-4.
- Taichman, D. B., Cybulsky, M. I., Djaffar, I., Longenecker, B. M., Teixeira, J., et al. (1991). Tumor cell surface alpha 4 beta 1 integrin mediates adhesion to vascular endothelium: demonstration of an interaction with the N-terminal domains of INCAM-110/VCAM-1. *Cell Regul* 2, 347-55.

- Takagi, J., Beglova, N., Yalamanchili, P., Blacklow, S. C. et Springer, T. A. (2001). Definition of EGF-like, closely interacting modules that bear activation epitopes in integrin beta subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11175-80.
- Takeda, K., Yasumoto, K., Kawaguchi, N., Udono, T., Watanabe, K., et al. (2002). Mitf-D, a newly identified isoform, expressed in the retinal pigment epithelium and monocyte-lineage cells affected by Mitf mutations. *Biochim Biophys Acta* 1574, 15-23.
- Takemoto, C. M., Yoon, Y. J. et Fisher, D. E. (2002). The identification and functional characterization of a novel mast cell isoform of the microphthalmia-associated transcription factor. *J Biol Chem* 277, 30244-52.
- Tamura, R. N., Rozzo, C., Starr, L., Chambers, J., Reichardt, L. F., et al. (1990). Epithelial integrin alpha 6 beta 4: complete primary structure of alpha 6 and variant forms of beta 4. *J Cell Biol* 111, 1593-604.
- Tassabehji, M., Newton, V. E. et Read, A. P. (1994). Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat Genet* 8, 251-5.
- Taylor, W. R. et Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803-15.
- Ten Berge, P. J., Danen, E. H., van Muijen, G. N., Jager, M. J. et Ruiter, D. J. (1993). Integrin expression in uveal melanoma differs from cutaneous melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 3635-40.
- The Collaborative Ocular Melanoma Study Group (1997). Mortality in patients with small choroidal melanoma. COMS report no. 4. *Arch Ophthalmol* 115, 886-93.
- Tortora, G. J. et Grabowski, S. (1994). Principes d'anatomie et de physiologie. Anjou: Centre Éducatif et Culturel.
- Tschentscher, F., Prescher, G., Horsman, D. E., White, V. A., Rieder, H., et al. (2001). Partial deletions of the long and short arm of chromosome 3 point to two tumor suppressor genes in uveal melanoma. *Cancer Res* 61, 3439-42.
- Tschentscher, F., Husing, J., Holter, T., Kruse, E., Dresen, I. G., et al. (2003). Tumor classification based on gene expression profiling shows that uveal melanomas with and without monosomy 3 represent two distinct entities. *Cancer Res* 63, 2578-84.
- Tulla, M., Pentikainen, O. T., Viitasalo, T., Kapyla, J., Impola, U., et al. (2001). Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha 1I, alpha 2I, and alpha 10I domains. *J Biol Chem* 276, 48206-12.

- Udono, T., Yasumoto, K., Takeda, K., Amae, S., Watanabe, K., et al. (2000). Structural organization of the human microphthalmia-associated transcription factor gene containing four alternative promoters. *Biochim Biophys Acta* 1491, 205-19.
- Ulitzur, N., Humbert, M. et Pfeffer, S. R. (1997a). Mapmodulin: a possible modulator of the interaction of microtubule-associated proteins with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5084-9.
- Ulitzur, N., Rancano, C. et Pfeffer, S. R. (1997b). Biochemical characterization of mapmodulin, a protein that binds microtubule-associated proteins. *J Biol Chem* 272, 30577-82.
- Van Der Velden, P. A., Zuidervaart, W., Hurks, M. H., Pavey, S., Ksander, B. R., et al. (2003). Expression profiling reveals that methylation of TIMP3 is involved in uveal melanoma development. *Int J Cancer* 106, 472-9.
- Van Hees, C. L., Jager, M. J., Bleeker, J. C., Kemme, H. et Bergman, W. (1998). Occurrence of cutaneous and uveal melanoma in patients with uveal melanoma and their first degree relatives. *Melanoma Res* 8, 175-80.
- Vaughan, D. G., Asbury, T. et Riordan-Eva, P. (1995). General ophthalmology. Norwalk: Editions Appleton & Lange.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-51.
- Vorum, H., Hager, H., Christensen, B. M., Nielsen, S. et Honore, B. (1999). Human calumenin localizes to the secretory pathway and is secreted to the medium. *Exp Cell Res* 248, 473-81.
- Walker, G. J., Flores, J. F., Glendening, J. M., Lin, A. H., Markl, I. D., et al. (1998). Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. *Genes Chromosomes Cancer* 22, 157-63.
- Walker, T. M., Van Ginkel, P. R., Gee, R. L., Ahmadi, H., Subramanian, L., et al. (2002). Expression of angiogenic factors Cyr61 and tissue factor in uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 120, 1719-25.
- Walter, W., Lingnau, K., Schmitt, E., Loos, M. et Maeurer, M. J. (2000). MHC class II antigen presentation pathway in murine tumours: tumour evasion from immunosurveillance? *Br J Cancer* 83, 1192-201.
- Watanabe, A., Takeda, K., Ploplis, B. et Tachibana, M. (1998). Epistatic relationship between Waardenburg syndrome genes MITF and PAX3. *Nat Genet* 18, 283-6.
- Weber, G. F. et Ashkar, S. (2000). Stress response genes: the genes that make cancer metastasize. *J Mol Med* 78, 404-8.

- Weidner, N. (1995). Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 147, 9-19.
- Weinel, R. J., Rosendahl, A., Pinschmidt, E., Kisker, O., Simon, B., et al. (1995). The alpha 6-integrin receptor in pancreatic carcinoma. *Gastroenterology* 108, 523-32.
- White, V. A., Chambers, J. D., Courtright, P. D., Chang, W. Y. et Horsman, D. E. (1998). Correlation of cytogenetic abnormalities with the outcome of patients with uveal melanoma. *Cancer* 83, 354-9.
- Whittard, J. D., Craig, S. E., Mould, A. P., Koch, A., Pertz, O., et al. (2002). E-cadherin is a ligand for integrin alpha2beta1. *Matrix Biol* 21, 525-32.
- Woll, E., Bedikian, A. et Legha, S. S. (1999). Uveal melanoma: natural history and treatment options for metastatic disease. *Melanoma Res* 9, 575-81.
- Wu, Y., Berends, M. J., Sijmons, R. H., Mensink, R. G., Verlind, E., et al. (2001). A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 29, 137-8.
- Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., et al. (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* 294, 339-45.
- Yabe, D., Nakamura, T., Kanazawa, N., Tashiro, K. et Honjo, T. (1997). Calumenin, a Ca²⁺-binding protein retained in the endoplasmic reticulum with a novel carboxyl-terminal sequence, HDEF. *J Biol Chem* 272, 18232-9.
- Yalamanchili, P., Lu, C., Oxvig, C. et Springer, T. A. (2000). Folding and function of I domain-deleted Mac-1 and lymphocyte function-associated antigen-1. *J Biol Chem* 275, 21877-82.
- Yin, L., Zhao, X., Fu, S., Garacia-Sanchez, F. et Deisseroth, A. B. (2001). [Correlation of cell apoptosis induction with expression of human beta5 integrin on hematopoietic cells]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 22, 13-6.
- Yoshitake, H., Rittling, S. R., Denhardt, D. T. et Noda, M. (1999). Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8156-60.
- Young, R. W. et Bok, D. (1969). Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol* 42, 392-403.
- Yu, H. S. (2002). Melanocyte destruction and repigmentation in vitiligo: a model for nerve cell damage and regrowth. *J Biomed Sci* 9, 564-73.
- Yun, Z., Menter, D. G. et Nicolson, G. L. (1996). Involvement of integrin alphavbeta3 in cell adhesion, motility, and liver metastasis of murine RAW117 large cell lymphoma. *Cancer Res* 56, 3103-11.

- Zang, Q. et Springer, T. A. (2001). Amino acid residues in the PSI domain and cysteine-rich repeats of the integrin beta2 subunit that restrain activation of the integrin alpha(X)beta(2). *J Biol Chem* 276, 6922-9.
- Zhang, B., Cunningham, M. A., Nichols, W. C., Bernat, J. A., Seligsohn, U., et al. (2003). Bleeding due to disruption of a cargo-specific ER-to-Golgi transport complex. *Nat Genet* 34, 220-5.